



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Lilian Caldas Quirino de Almeida

Avaliação do reparo ósseo em defeitos críticos preenchidos com biocerâmicas sintéticas e uma membrana sintética à base de polidioxanona.

Araraquara

2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Lilian Caldas Quirino de Almeida

Avaliação do reparo ósseo em defeitos críticos preenchidos com biocerâmicas sintéticas e uma membrana sintética à base de polidioxanona.

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Doutora em Ciências Odontológicas, na Área de Diagnóstico e Cirurgia

Orientador: Valfrido Antônio Pereira Filho

Araraquara

2022

A447a

Almeida, Lilian Caldas Quirino de

Avaliação do reparo ósseo em defeitos críticos preenchidos com biocerâmicas sintéticas e uma membrana sintética à base de polidioxanona. : Avaliação do reparo ósseo em defeitos críticos preenchidos com biocerâmicas sintéticas e uma membrana sintética à base de polidioxanona. / Lilian Caldas Quirino de Almeida. -- Araraquara, 2022

124 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Valfrido Antonio Pereira Filho Pereira Filho

1. Substitutos Ósseos. 2. Modelos animais. 3. Materiais biomédicos. I. Título.

Lilian Caldas Quirino de Almeida

Avaliação do reparo ósseo em defeitos críticos preenchidos com biocerâmicas sintéticas e uma membrana sintética à base de polidioxanona.

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora em Ciências Odontológicas

Presidente e orientador: Prof. Dr. Valfrido Antônio Pereira Filho

2º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Silva Monnazzi

3º Examinador: Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato

4º Examinador: Prof. Dra. Roberta Okamoto

5º Examinador: Prof. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni

Araraquara, 04 de março de 2022

DADOS CURRICULARES

Lilian Caldas Quirino de Almeida

Nascimento	04/05/1984 – São Paulo, São Paulo, Brasil
Filiação	Benedita de Jesus Caldas Quirino Bento Quirino Neto
2005-2008	Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-FOAr/Unesp, São Paulo. Título: Características Antropométricas dos Cirurgiões Dentistas e Design de Equipamentos Odontológicos. Orientador: Camila Pinelli. Bolsista Bolsa de Apoio Acadêmico e Extensão III, UNESP, Brasil.
2008 – 2009	Estágio em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pelo Hospital Municipal do Tatuapé - Dr. Cármino Caricchio. São Paulo, São Paulo, Brasil.
2009 – 2012	Residência em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos, CHPBG, São Paulo, Brasil. Bolsista da: FUNDAP.
2012 – 2014	Mestrado em Odontologia, área de Patologia Bucal/ Estomatologia (Conceito CAPES 5).Universidade de São Paulo-USP, Brasil. Título: Expressão imuno-histoquímica da Axina1, GSK3 β , APC e via Wnt1 nos ameloblastomas, Orientador: Décio dos Santos Pinto Júnior. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
2018- 2022	Doutorado em andamento em Ciências Odontológicas, área de Diagnóstico e Cirurgia (Conceito CAPES 5) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Orientador: Valfrido Antônio Pereira Filho. Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Grande área: Ciências da Saúde.
2019 – 2020	Docente da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial na Universidade Nove de Julho- UNINOVE, São Paulo, São Paulo, Brasil.
Atual	Cirurgiã Bucomaxilofacial do Centro de Especialidades Odontológicas- CEO-Vera Cruz, Prefeitura de São Paulo. São Paulo, São Paulo, Brasil e Docente da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial na Universidade Nove de Julho- UNINOVE, São Paulo, São Paulo, Brasil.

Dedico este trabalho aos meus pais, minha base, **Benedita de Jesus Caldas Quirino** e **Bento Quirino Neto** e ao meu querido esposo e amigo, **Fábio Francisco Tavares de Almeida**.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais essa promessa cumprida na minha vida, por me guardar nas viagens para realizar esse doutorado, por me dar sabedoria e principalmente perseverança.

Aos meus pais, Benedita de Jesus Caldas Quirino e Bento Quirino Neto, por toda a base sólida da minha criação e educação, por sempre acreditar e incentivar os meus estudos, por todos os sacrifícios feitos para que hoje eu pudesse alcançar mais esse objetivo.

Ao meu esposo e amigo, Fábio Francisco Tavares de Almeida, por todo o amor e apoio desde a inscrição até a defesa, por todo o suporte emocional, por não me deixar desistir quando desanimei, por toda ajuda, desde as fórmulas do Excel até a formatação, por cuidar do nosso lar quando me afastei para realizar este doutorado, eu não tenho palavras para agradecer por tanto, não conseguiria sem você, eu te amo.

À minha família, minha irmã, Tatiane Caldas Quirino, colegas de profissão, pelo incentivo e apoio, à minha sogra, Vera Lúcia Tavares de Almeida, sempre tão preocupada com o meu bem-estar e a minha vida na estrada, minha cunhada querida, Fernanda Aparecida Tavares de Almeida, minha irmã de coração e minha cúmplice, minha cunhada Fabiana Tavares de Almeida e sobrinha Michaely de Almeida Silva, a qual já plantei a sementinha da pesquisa no seu coração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valfrido Antônio Pereira Filho, por realmente me orientar, por me deixar voar e aproveitar as oportunidades de vivência que a vida acadêmica me proporcionou, e por ser um amigo quando eu precisei.

À minha querida Profa Dra. Roberta Okamoto, por todo apoio, amizade, trocando fotos dos experimentos e dos filhos caninos, toda a ajuda, sempre tão acessível e com tanta clareza nas explicações, pela paciência, compreensão, dedicação e esforços, seria quase impossível realizar todo esse trabalho sem a sua ajuda, minha eterna gratidão a você e suas alunas igualmente queridas, Paula Buzo Frigério e Naara Gabriela Monteiro.

Ao Prof. Dr. Rubens Spin Neto, pela contribuição e presteza em colaborar com esse trabalho.

Aos Professores Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli, Eduardo Hochuli Vieira, Roberto Henrique Barbeiro, José Scarso Filho, Marcelo Silva Monnazzi, Andreia Bufalino, Estela Sasso Cerri, Elaine Maria Sgavioli Massucato pela oportunidade de

aprender com cada conversa e cada atividade clínica, vocês serão sempre meus mestres.

Ao Cristiano Afonso Lamounier por todas as orientações, desde o processo seletivo até a fase final, sempre disposto a ajudar.

À Thelma Aparecida Gonçalves e ao Antônio Medeiros filho, pelas conversas, conselhos e amizade e todo o suporte técnico.

À Ana Cláudia Gregolin Costa Miranda, pela paciência nas instruções de funcionamento do laboratório e orientações de processamento das amostras, bem como das conversas e dicas de compras.

À Suleima Ferreira, sempre tão prestativa, me socorrendo para tornar possível o quase impossível, pelo bilhetinho no último dia de inclusão das peças em parafina, para sempre guardado no meu coração, com muito carinho.

À Priscila Gabriela Gentile Consolaro, por toda ajuda, bons papos e risadas para aliviar a distância e saudades de casa.

Ao Professor Dr. Laurival Antonio de Luca Júnior, pelo uso do biotério e fornecimento dos animais para essa pesquisa e pelos esclarecimentos nos momentos de dúvidas, bem como, Micail (*in memoriam*) pelas orientações e ajudas nos recebimentos dos animais.

Aos meus queridos amigos de pós-graduação, Guilherme dos Santos Trento, Pedro Henrique Azambuja Carvalho, Renato Torres Augusto Neto, Luiz Henrique Torres e Cássio Camachio, sem os quais seria impossível realizar um trabalho com essa magnitude, com tantos animais, procedimentos, vocês foram vitais, tanto para a execução quanto para tornar mais leve todo esse trabalho, obrigada pela ajuda, risadas, viagens e perrengues.

Às minhas amigas que a pós-graduação me deu, Audrey Foster Lefort Rocha, Gabriely Ferreira, Deborah Laurindo Pereira Santos, pela parceria nos trabalhos apresentados em congressos, pelos momentos compartilhando as lágrimas e risadas.

Ao amigo Giovanni Cunha, pela parceria nos trabalhos, congressos e amizade.

À todos do apoio técnico para as análises deste trabalho, Pedro Sérgio Simões, com os cortes histológicos.

À Sybele Saska e Magda Nagasawa, representando a empresa Plenum®, pela confiança e apoio para a execução desse trabalho, com fornecimento dos materiais e dos insumos das análises, além de todo o apoio técnico e científico.

A todos os residentes do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia pela amizade e presteza e colaboração com os casos clínicos apresentados.

Minha amiga Rachel Maccheronio Dalmaso, que tanto me ajudou no início da minha vida de docente e acompanhou todas as principais e mais difíceis etapas dessa jornada, pelas traduções, obrigada por me entender tão bem.

Aos meus amigos dos CEO Vila Carrão, que tanto me apoiaram quando eu fazia a histometria entre um paciente e outro, vocês são especiais. Aos meus amigos do CEO Vera Cruz, que me receberam de braços abertos e também entendem a minha “reclusão” para terminar a minha tese.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), à Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial ao diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos e a Vice-Diretora, Profa. Dra. Patrícia P. N. S. Garcia, que foi minha co-orientadora no meu Trabalho de conclusão de curso da graduação, nessa faculdade, minha base desde a graduação, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, no departamento da Diagnóstico e Cirurgia, sob a coordenação da Profa. Dra. Andreia Bufalino, por tornar real a realização desta tese.

À todos os animais, que literalmente deram a vida para que essa pesquisa fosse realizada, com muito respeito e carinho por cada animal utilizado.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”¹□
Dalai Lama

¹* Disponível em: <http://fradesfranciscanos.com.br/meditacao/o-periodo-de-maior-ganho-em-conhecimento-e-experiencia-e-o-periodo-mais-dificil-da-vida-de-alguem-dalai-lama>.

Almeida LCQ. Avaliação do reparo ósseo em defeitos críticos preenchidos com biocerâmicas sintéticas e uma membrana sintética à base de polidioxanona [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

O uso de materiais regenerativos é uma das técnicas indicadas para a reconstrução de defeitos ósseos, com resultados mais eficazes e previsíveis, graças ao desenvolvimento da bioengenharia. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de reparo ósseo utilizando biocerâmicas sintéticas e membrana absorvível a base de polidioxanona (PDO) em defeitos ósseos críticos, realizados em calvária de ratos. Os resultados foram formatados em 3 artigos científicos. Sendo, que os dois primeiros estão relacionados às biocerâmicas e o terceiro artigo, com a regeneração óssea guiada por meio da membrana de polidioxanona. Em todos os artigos foram realizadas análises de histometria, microtomografia computadorizada, imunoistoquímica e PCR. Neste estudo foram utilizados 185 animais, com a confecção de dois defeitos críticos por animal, divididos em 10 grupos experimentais, preenchidos da seguinte forma: G1: Plenum® Oss HA (PHA), G2: coágulo sanguíneo (CG); G3: Plenum® Oss β -TCP, G4 (PB): Cerasorb® (CS) G5: Plenum® Oss hp (PO), G6: BoneCeramic® (BC), G7: Plenum® Oss hp + Plenum® Guide (PG), G8: Plenum® Guide + coágulo (PC), e G9: Bio-Gide® + Plenum® Oss (BG) hp e G10: Bio-Gide® + coágulo (BC). Os animais foram submetidos a eutanásia após os períodos de 07, 15, 30 e 60 dias. As amostras foram coletadas e preparadas para todas as análises propostas. Na comparação entre os grupos PO e BC, não observamos diferenças estatisticamente significantes entre a formação de tecido conjuntivo, tecido ósseo e os remanescentes do biomaterial entre os grupos. Na comparação entre os grupos PB e CS, dentro dos parâmetros avaliados, não houve diferença estatística entre si, contudo, as condições celulares iniciais foram mais favoráveis para o grupo PB, ao avaliar às análises de biologia molecular. Quando comparados os grupos PG e BG, não observamos diferenças significativas pelas análises de histometria e microtomografia computadorizada, porém, o grupo PG apresentou uma imunomarcção melhor em relação ao grupo BG. Concluímos que os materiais testados pelas análises propostas neste estudo apresentaram resultados satisfatórios e não apresentaram diferenças em comparação aos demais materiais comparadores, sendo, portanto, considerados uma opção viável como substituto ósseo sintético, bem como barreira na regeneração óssea guiada.

Palavras chave: Substitutos ósseos. Polidioxanona. Materiais biomédicos.

Almeida LCQ Evaluation of bone repair in critical defects filled with synthetic bioceramics and a synthetic membrane based on polydioxanone [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

The use of regenerative materials is one of the techniques indicated for the repair/reconstruction of bone defects, with more effective and predictable results, thanks to the development of bioengineering. The objective of this work was to evaluate the bone repair process using synthetic bioceramics and a polydioxanone (PDO)-based resorbable membrane in critical bone defects in rat calvaria. The results were formatted in 3 scientific articles. The first two are related to bioceramics and the third article, with bone regeneration guided by a polydioxanone membrane. Histometry, computed microtomography, immunohistochemistry, and PCR analyzes were performed in all three articles. 185 rats were used in this study, with two critical defects per animal, divided into 10 experimental groups as follows: G1: Plenum® Oss HA (PHA), G2: blood clot (CG); G3: Plenum® Oss β -TCP, G4 (PB): Cerasorb® (CS) G5: Plenum® Oss hp (PO), G6: BoneCeramic® (BC), G7: Plenum® Oss hp + Plenum® Guide (PG), G8: Plenum® Guide + clot (PC), and G9: Bio-Gide® + Plenum® Oss (BG) hp and G10: Bio-Gide® + clot (BC). The animals were euthanized after periods of 07, 15, 30, and 60 days. The samples were collected and prepared for all proposed analyses. Comparing the PO and BC groups, we did not observe statistically significant differences between the formation of connective tissue, bone tissue, and biomaterial remnants amongst the groups by the proposed analyses. In the comparison between the PB and CS groups, within the evaluated parameters, there were no statistical differences between them, however, the initial cellular conditions were more favorable for the PB group by the molecular biology analyses. When comparing the PG and BG groups, we did not observe significant differences by histometry and computed microtomography analyses, however, the PG group presented better immunostaining in relation to the BG group. We conclude that the materials tested by the analyzes proposed in this study presented satisfactory results and did not present differences compared to the other control materials, therefore, considered viable options as synthetic bone substitutes, as well as a barrier in guided bone regeneration.

Keywords: Bone substitutes. Polydioxanone. Biomedical materials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura A1- Distribuição das análises dos grupos das biocerâmicas, constando a distribuição dos animais quanto aos tipos de análises, períodos de eutanásia e número de amostras	110
Figura A2- Distribuição das análises dos grupos de regeneração óssea guiada, constando a distribuição dos animais quanto aos tipos de análises, períodos de eutanásia e número de amostras.....	111
Figura A3- Confeção e preenchimento dos defeitos críticos em calvária de ratos. Grupos das Biocerâmicas.....	112
Figura A4- Confeção e preenchimento dos defeitos críticos em calvária de ratos. Grupos ROG.....	113
Figura A5- Processamento das amostras.....	114
Figura A6- Histometria do Grupo1, Plenum® Oss HA, período de 60 dias.....	116
Figura A7- Histometria do Grupo Plenum® Oss HA, período de 60 dias, ilustrando as mensurações por Threshold de cores, realizada pelo software ImageJ.....	117
Figura A8- Processamento das amostras para análise de PCR.....	119
Figura A9- Reconstrução bidimensional (2D). Projeção para imagens volumétricas 3D, <i>DataViewer</i> ® v. 1.4.1.....	121
Figura A10- Grupo 7 Plenum Guide®+ Plenum® Oss _{hp} ®, no lado direito do defeito e: Plenum Guide® + Coágulo, lado esquerdo do defeito, VOI- Plano Axial.....	122
Figura A11- Grupo 7 Plenum Guide®+ Plenum® Oss _{hp} ®, no lado direito do defeito e: Plenum Guide® + Coágulo, lado esquerdo do defeito, VOI- Plano coronal.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TGF- β	Fator de Crescimento de Transformação- β
BMP2	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
RANK-L	Receptor Ativador Nuclear Kappa – Ligante
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
OCN	Osteocalcina
HA	Hidroxiapatita
α -TCP	α - Fosfato Tricálcico
β -TCP	β - Fosfato Tricálcico
ROG	Regeneração Óssea Guiada
PDO	Polidioxanona
PLGA	Poli (lático-co-glicólico)
FDA	Food and Drug Administration
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
μ CT	Microtomografia Computadorizada
VOI	Volume de Interesse
RUNX2	Fator de transcrição 2 relacionado à runt
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
IBSP	Sialoproteína óssea
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo
Tb.N	Número Trabecular em mm
Tb.Sp	Separação Trabecular em mm
Tb.Th	Espessura Trabecular em mm
Conn Dn	Densidade de conexões em mm ³

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	22
3 PUBLICAÇÕES	23
3.1 Publicação 1	24
3.2 Publicação 2	51
3.3 Publicação 3	76
4 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	105
APÊNDICE A	109
ANEXO A	124

1 INTRODUÇÃO

Defeitos ósseos críticos são classificados como aqueles em que o reparo ósseo não se completa espontaneamente, havendo necessidade da utilização de enxertos para o preenchimento ou reconstrução e concomitante estimulação da neoformação óssea⁷. Esses enxertos podem variar conforme sua origem entre autólogos, homogêneos, heterogêneos ou substitutos ósseos sintéticos (materiais aloplásticos), sendo utilizados separadamente ou de maneira combinada^{1,2}.

Fatores fisiológicos, traumáticos, patológicos ou congênitos podem condicionar ou agravar a reabsorção óssea das cristas alveolares, levando a uma situação clinicamente limitante, inviabilizando a reabilitação oral por meio de implantes osseointegráveis^{3,4}. Além disso, a regeneração óssea é um processo fisiológico complexo que visa a restauração ou manutenção da função óssea^{5,6}. Esse processo envolve múltiplas fases que incluem a reabsorção do tecido ósseo necrosado e do coágulo subsequente ao trauma e desenvolvimento de processo inflamatório que propicia a liberação de fatores de crescimento que irão auxiliar na diferenciação celular e consequente formação do tecido ósseo.

Embora bastante semelhantes em vários aspectos a outros processos de reparo no organismo, o tecido ósseo demanda a presença de células osteogênicas progenitoras, sinalização osteoindutora, matriz osteocondutiva e adequado aporte sanguíneo, pois a vascularização local representa um importante fator no reparo ósseo em que há a liberação de fatores de crescimento, facilitação de oxigenação local e afluxo de nutrientes^{7,8,9}.

A osteocondução é a capacidade do enxerto ou substituto ósseo em auxiliar o reparo tecidual, permitindo a infiltração vascular e a quimiotaxia de elementos celulares envolvidos na formação do osso como células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos, osteoclastos e outros. A osteoindução consiste no processo de indução da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas e de células osteoprogenitoras em osteoblastos após a exposição a moléculas provenientes do enxerto ou substituto ósseo^{5,7}.

Tal cascata de eventos celulares é mediada por inúmeros fatores de diferenciação, entre eles fator de crescimento de transformação- β (TGF- β , *Transforming Growth Factor- β*) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's, *Bone*

Morphogenetic Protein). Por fim, a osteogênese é a formação de novo osso a partir de células mesenquimais indiferenciadas e células osteoprogenitoras oriundas do enxerto ou do hospedeiro. Essas células desempenham papel importante como progenitoras de osteoblastos e são responsáveis por parte do equilíbrio homeostático, além de participarem da regulação da osteoclastogênese por meio da expressão do RANK-L (*Receptor Activator, Nuclear Kappa – Ligand*) e do OPG (*osteoprotegerina*)⁵.

As biocerâmicas representam uma classe de materiais regenerativos desenvolvidas no intuito de servir de arcabouço mineralizado para proliferação de células progenitoras ósseas, principalmente pelo fato de apresentarem em sua composição fosfato de cálcio e por possuir uma composição química similar ao tecido ósseo. As biocerâmicas sintéticas apresentam características osteocondutivas em testes *in vitro* e *in vivo*, servindo não apenas como arcabouço, mas também estimulando a migração celular^{10,11,12,13}.

A combinação de íons cálcio e fósforo em suas apresentações mais estáveis, a hidroxiapatita (HA) e os fosfatos tricálcicos α -TCP e β -TCP, constituem uma estrutura química de cerâmicas mais bioativas^{14,15}. Estes compostos sintéticos são química e estruturalmente similares à matriz óssea mineral dos mamíferos, o que pode ser priorizado seu uso como substituto ósseo para a reparação óssea^{16,17}.

Neste contexto, um substituto ósseo ideal deve apresentar variedade de forma e tamanho, e adequadas propriedades mecânicas e biológicas, além disso, deverão ser biocompatíveis, osteocondutivos, bioativos e preferencialmente absorvíveis, para que possam ser substituídos por osso neoformado. Em geral, materiais absorvíveis aloplásticos são os mais escolhidos para a regeneração óssea, pois funcionam como uma matriz para o aumento de volume e para a manutenção do espaço do defeito, sendo gradualmente substituídos pelo osso neoformado¹⁸.

Nery, em 1975, foi pioneiro no uso de biocerâmicas em defeitos ósseos periodontais induzidos em animais, desde então diversos estudos buscaram otimizar as aplicações das biocerâmicas na regeneração óssea^{11,12,15,19}.

Dentro do escopo das pesquisas realizadas com HA e β -TCP foi observado que, enquanto a primeira apresentava uma reabsorção mais lenta, o segundo tinha uma alta taxa de reabsorção nos primeiros dias após a aplicação em defeitos ósseos em animais^{19,20,21}. A reabsorção do β -TCP está relacionada diretamente às fases de fosfato de cálcio, que é a sua respectiva razão molar Ca^{2+}/P , a qual está diretamente

relacionada a sua taxa de degradação, ou seja, quanto maior a razão molar Ca^{2+}/P , menor será a taxa de degradação *in vitro* ou *in vivo*^{18,22}.

Devido a sua lenta taxa de reabsorção, a HA também apresenta deficiências no processo de neoformação óssea, no entanto é capaz de manter a estrutura e o arcabouço por um período duradouro²³. Por outro lado, o β -TCP apresenta alta solubilidade e rápida reabsorção, favorecendo a neoformação óssea, mas dificultando a manutenção do arcabouço^{14,17}. Contudo, a taxa de degradação também está diretamente relacionada ao tamanho das partículas e a cristalinidade da biocerâmica. Partículas nanométricas degradam mais rapidamente do que as partículas submicron e micrométricas, devido às nanopartículas favorecerem a ação mais rápida dos osteoclastos ou macrófagos sobre a superfície do biomaterial. A cristalinidade também altera a taxa de degradação, uma vez que estruturas altamente cristalinas são mais resistentes à dissolução do que estruturas amorfas ou semi-cristalinas²⁴.

Mais recentemente, as evoluções ocorridas no processo de fabricação permitiram a síntese de β -TCP com porosidades interconectadas, não interferindo nas propriedades mecânicas do material. O β -TCP Cerasorb® tem, multi poros abertos interconectados, com micro, médio e macroporos (5 μm - 500 μm) e uma porosidade geral de aproximadamente 65%. Os grânulos são poligonais, com formato irregular e aumentam a intercalação e o travamento no interior da cavidade do defeito^{14,17,25}.

Em contrapartida, na tentativa de melhorar os resultados obtidos com β -TCP novas associações têm sido implementadas na área das biocerâmicas. Desta forma, as biocerâmicas bifásicas (HA/ β -TCP) têm sido desenvolvidas por combinarem as propriedades favoráveis das duas cerâmicas, promovendo ao mesmo tempo uma reabsorção mais lenta, mas permitindo a manutenção do arcabouço para a neoformação óssea em percentuais maiores^{10,13,15,17,20,21}.

Inicialmente o processo de fabricação da biocerâmica bifásica (HA/ β -TCP) por sinterização, em temperaturas elevadas, limitou sua utilização nos procedimentos de enxertia^{11,14,17,26}. Este processo não permitia a formação de micro e nanoporosidades no material, necessários para a migração celular e vascular e à incorporação do enxerto²⁵.

A biocerâmica Straumann® BoneCeramic™, é uma biocerâmica bifásica sintética, composta por 60% de hidroxiapatita e 40% de β -fosfato tricálcio, sinterizado a uma temperatura de 1100 – 1500°C, com porosidade de 90%, sendo esses poros interconectados de 100 a 500 μm de diâmetro, considerado como um biomaterial

osteocondutor. Novos compostos de HA/ β -TCP têm sido lançados comercialmente desde então, e a proporção entre os componentes têm sido objeto de pesquisa constante. Proporções de HA/ β -TCP: 20/80, 30/70, 40/70, 50/50, 60/40, 70/30 e 80/20 já foram testadas na literatura^{12,13,15,19,21,27}.

Uma nova biocerâmica bifásica foi desenvolvida pela empresa Plenum[®], sob o nome comercial de Plenum[®] Oss_{hp}[®], constituída de hidroxiapatita e β -fosfato de tricálcio (HA: β -TCP) na proporção 70:30. A macro e microporosidade garante um crescimento celular osteogênico eficiente promovendo a regeneração óssea no sítio do defeito ósseo. Por sua vez, a microporosidade e rugosidade superficial facilitam a difusão de fluidos biológicos e a adesão celular. Além disso, a macro e microestrutura, apresenta área superficial de 1,85 m²/g, porcentagem de porosidade de 52,32%, com diâmetro médio interno de 0,34 μ m e densidade real 3.5870 g/cm³, que conferem alta propriedade hidrofílica ao produto, tornando-o facilmente manipulável em fluidos (soro fisiológico, plasma rico em plaquetas e fibrina ou sangue do próprio paciente) em diversas aplicações para reconstrução óssea.

Foram realizados estudos pré-clínicos com modelo animal, em ratos, para a biocerâmica Plenum[®] Oss_{hp}, testes relacionados à sensibilidade dérmica maximizada, reatividade intracutânea e toxicidade aguda, atendendo à todas as normas internacionais, e com resultados satisfatórios para cada teste. Fonte: M3Health Ind. Com. De Prod. Odont. e Correlatos SA, Jundiaí, São Paulo, Brasil.

Em geral, os materiais regenerativos sintéticos absorvíveis são os materiais de escolhas para reparação óssea; visto que, estes materiais são isentos de possíveis contaminantes ou moléculas orgânicas advindas dos enxertos homogêneos e heterogêneos, os quais possam induzir respostas imunológicas²⁸.

Ainda não há um consenso sobre a proporção mais indicada para procedimentos de enxertia óssea, devendo provavelmente tal proporção ser ajustada de acordo com as condições de cada indivíduo, para pacientes que necessitem da manutenção do arcabouço por mais tempo, a proporção de HA deve ser maior do que a de β -TCP e para o paciente que já possui um arcabouço e necessitam de uma maior taxa de neoformação a proporção de β -TCP deve ser maior que a de HA¹⁷.

Além do uso de substitutos ósseos, as técnicas de regeneração óssea guiada (ROG;) também apresentam alta relevância clínica^{2,3,29,30}. A ROG é uma abordagem terapêutica que induz a osteopromoção pelo uso de membranas, absorvíveis e não absorvíveis, como barreiras mecânicas. As membranas têm como função evitar a

migração de células epiteliais para o interior defeito, promovendo a manutenção do espaço do defeito ósseo e novos estudos sugerem mais um novo papel para a utilização de membranas, com evidências celulares e moleculares do comportamento bioativo, ao invés de uma barreira passiva das membranas, contribuindo com maior eficácia para favorecer a neoformação óssea^{30,31,32}.

Enquanto as membranas absorvíveis, usualmente fabricadas com colágeno, apresentam como vantagem a permeabilidade e nutrição do tecido adjacente, apresentam a desvantagem de serem rapidamente absorvidas, antes do tempo necessário para incorporação do enxerto^{29,31}. Por outro lado, as membranas baseadas em polímeros sintéticos, não absorvíveis ou absorvíveis, mantem o espaço ou substituto ósseo de preenchimento/reconstrução no local desejado por um período mais prolongado, com previsibilidade clínica desejável até sua remoção ou reabsorção. No entanto, as membranas não absorvíveis apresentam a desvantagem de não permitir a nutrição do tecido adjacente e necessitarem de um procedimento cirúrgico adicional para a sua remoção^{30,33}. Nesse aspecto, se faz necessária pesquisa e desenvolvimento de novas membranas sintéticas absorvíveis para ROG, as quais refletem em resultados clínicos com boa previsibilidade. Dentre as propriedades requeridas para uma membrana com finalidade para ROG incluem: bioatividade, adequado tempo de reabsorção, biocompatibilidade e habilidade de manutenção do espaço durante o processo de reparação do defeito ósseo³⁴.

Adicionalmente, dependendo do processo empregado na produção de membranas baseada em polímeros sintéticos, estas membranas podem promover excelente bioatividade, devido a sua composição química, área e topografia superficial, favorecendo uma melhor interação célula/material.

Dentre os polímeros sintéticos, o polidioxanona (PDO) têm emergido como uma excelente alternativa para produção de materiais para engenharia tecidual, pela sua excelente resposta celular em relação à proliferação/diferenciação e biocompatibilidade, além de possuir elevada força mecânica e moderada taxa de degradação *in vivo*^{35,36}.

A polidioxanona é um polímero sintetizado pelo monômero precursor *p*-dioxanona, onde possui um oxigênio do grupo éter na estrutura de cadeia polimérica, conferindo flexibilidade ao material e são degradados por hidrólise.

A maioria dos materiais regenerativos poliméricos sofrem degradação enzimática, principalmente os de origem animal, como as membranas a base de

colágeno, já os polímeros degradáveis por hidrólise, como a PDO, são polímeros que possuem ligações químicas hidroliticamente lábeis em sua cadeia. Os grupos funcionais suscetíveis para hidrólise incluem ésteres, anidridos, carbonatos, amidas, entre outros. A degradação dos polímeros α -ésteres, ocorre por meio de uma cisão não específica destas ligações éster e essa degradação depende da porosidade, cristalinidade, peso molecular, e área superficial, sendo que os grupos terminais ácidos aumentam a propriedade hidrofílica e catalisam a reação. Os subprodutos finais são excretados principalmente na urina, sendo o restante eliminado por meio de digestão celular ou exalado como dióxido de carbono³⁷.

Rowland *et al.*³⁸, relataram que *scaffolds* à base de PDO apresentaram resultados superiores a *scaffolds* de poli-lático-glicólico (PLGA) em relação a diferenciação de células-tronco mesenquimais em células osteoblásticas e condrogênicas³⁸. Além disso, o PDO tem sido amplamente utilizado como material absorvíveis de sutura, com aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA), além de apresentar um perfil seguro para aplicação em dispositivos médicos, como em placas para o fechamento de comunicação oronasal, perfuração de septo, reconstrução de soalho de órbita pela taxa de leve a moderada reação inflamatória de corpo estranho e completa degradação dentro de 5 a 12 meses, dependendo do método e condições do processo de manufatura^{39,40}. Contudo, os relatos na literatura em relação à segurança biológica e as propriedades químicas e mecânicas do PDO, permite confiabilidade no desenvolvimento de novos produtos à base de PDO para aplicações em reparação/regeneração tecidual.

Neste estudo, foi avaliada uma nova membrana sintética e absorvível, a base de polidioxanona, sob nome comercial de Plenum® Guide (M3 Health Ind. Com. de Prod. Med. Odont. e Correlatos S.A, Jundiaí, Brasil), apresentando cristalinidade de 55%, formada por filamentos com diâmetros entre 500 nanômetros a 2 micrômetros.

Foram realizados testes mecânicos, teste de intumescimento e de resistência à tração, bem como estudos pré-clínicos, em modelo animal com ratos, para avaliar a sensibilização dérmica maximizada e teste de toxicidade sistêmica aguda, todos de acordo as normas internacionais, e com resultados satisfatórios para todos os testes realizados³⁷.

Os materiais regenerativos atuais disponíveis no mercado, são de origem animal ou sintética, e em sua maioria, produzidos a partir de materiais importados, o que aumenta o custo devido ao uso de tecnologia estrangeira e das taxas de

importação, custos esses, que são repassados para os pacientes, aumentando o valor do procedimento.

Com o desenvolvimento de novos materiais regenerativos sintéticos, de origem nacional, obtidos por novos processos de fabricação, estes custos podem ser reduzidos, devido ao uso de tecnologia nacional, e, por ser de origem sintética, terá uma disponibilidade em menor tempo, pois não depende das etapas de processamento das quais os materiais regenerativos de origem animal necessitam ser submetidos. A partir desses aspectos, portanto, a produção pode ser em maior escala, atendendo todo o mercado nacional e internacional, gerando desenvolvimento ao país em todas as esferas de mercado.

Para a inserção de novos materiais regenerativos no mercado deve ser precedida por pesquisas bem delineadas e, preferencialmente, em modelo animal, com avaliações completas, como a análise de microtomografia computadorizada, a qual permite avaliar a arquitetura dos tecidos e dos remanescentes de biomateriais sem a destruição das amostras, permitindo que outras análises possam ser realizadas, como a histometria e análises de biologia molecular, como a imunohistoquímica e a expressão gênica, a fim de determinar sua previsibilidade, eficácia e segurança.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos críticos de calvária de ratos, utilizando uma biocerâmica bifásica, bem como, por regeneração óssea guiada, por meio de uma membrana absorvível sintética, à base de polidioxanona (PDO) *. A partir da proposição, originou três publicações distintas, sendo:

Publicação 1: Comparar o processo de reparo ósseo, em modelo animal, por meio de análises de histometria, expressão gênica, imunoistoquímica e de microtomografia computadorizada de Plenum® Osshp e BoneCeramic® no preenchimento de defeitos críticos em modelo animal.

Publicação 2: Avaliar a processo de reparo ósseo, em modelo animal, de biocerâmica, Plenum® Oss β -TCP, por meio de análise histométrica, microtomografia computadorizada, expressão gênica e imunoistoquímica.

Publicação 3: Avaliar por meio de análises imunoistoquímica, expressão gênica, histométrica e microtomografia computadorizada, o processo de regeneração óssea guiada com o uso de membrana de polidioxanona (Plenum® Guide), no tratamento de defeitos críticos em calvária de ratos.

* Materiais e Métodos em Apêndice A.

3 PUBLICAÇÕES

O desenvolvimento desse projeto de pesquisa gerou três artigos científicos originais, a saber:

- 1) “Avaliação do reparo ósseo de uma nova biocerâmica sintética bifásica. Avaliação histométrica, expressão gênica, imunoistoquímica e microtomográfica”.
- 2) “Avaliação do reparo ósseo de uma nova biocerâmica de β fosfato tricálcico. Avaliação histométrica, microtomográfica, expressão gênica e imunoistoquímica”.
- 3) “Avaliação da regeneração óssea guiada por meio de membrana a base polidioxanona. Avaliação imunoistoquímica, expressão gênica, histométrica e microtomográfica”.

3.1 Publicação 1

AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO UTILIZANDO UMA NOVA BIOCERÂMICA SINTÉTICA BIFÁSICA. AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA, EXPRESSÃO GÊNICA, IMUNOISTOQUÍMICA E MICROTOMOGRÁFICA.

Lilian Caldas QUIRINO^a, Pedro Henrique de Azambuja CARVALHO^a, Guilherme dos Santos TRENTTO^a, Naara Gabriela MONTEIRO^b, Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli^a, Roberta OKAMOTO^b, Valfrido Antonio PEREIRA-FILHO^a

^a Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara, Araraquara, Brasil.

^b Departamento de Ciências Básicas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Araçatuba, Brasil.

Palavras-chave: Biocerâmica bifásica. Substitutos ósseos. Modelo animais

Fonte de financiamento: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) –Código de Financiamento 001.

Endereço completo do autor para correspondências:

Lilian Caldas Quirino

Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, Brasil.

Rua Humaitá, 1680

CEP 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brasil

E-mail: lc.quirino@unesp.br

3 Artigo formatado de acordo com as normas para publicação no periódico Materials – Qualis CAPES A2 – Fator de Impacto 3.623 (2020). Journal Rank: JCR - Q1 (*Metallurgy & Metallurgical Engineering*) / Cite Score - Q2 (*Condensed Matter Physics*) Índice H (Scopus) 2018: 83. ISSN 1996-1944

Resumo

Introdução: As biocerâmicas bifásicas são substitutos ósseos sintéticos compostos por Hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico, que possuem propriedades osteocondutoras, sendo química e estruturalmente similares à matriz óssea, conferindo maior segurança e boa previsibilidade no processo de regeneração óssea. **Objetivo:** Avaliar o processo de reparo ósseo com a utilização de uma nova biocerâmica bifásica de origem sintética (Plenum® Osshp) em defeitos críticos. **Materiais e métodos:** Foram confeccionados 111 defeitos críticos em calvária de ratos, divididos em 3 grupos: Plenum® Osshp (PO); Straumann® BoneCeramic™ (BC) e Plenum® Oss HÁ (PHA). A eutanásia foi realizada nos períodos de 07, 15, 30 e 60 dias após as cirurgias. As amostras foram submetidas às análises de histometria, expressão gênica (RUNX2, IBSP e VEGF), imunistoquímica (RUNX2, OPN e OCN) e microtomografia (Micro CT). **Resultados:** A análise de histometria não mostrou diferenças para a formação de tecido conjuntivo e tecido ósseo entre os grupos PO e BC, entretanto, foi observado uma maior quantidade de biomaterial remanescente no grupo PO aos 60 dias. A análise microtomográfica também não demonstrou diferenças entre o tecido mineralizado, exceto por uma menor densidade de conectividade óssea e uma maior espessura das trabéculas dos remanescentes de PO. Na análise de PCR, observamos uma menor expressão gênica para RUNX2 e VEGF, porém, com maior expressão para IBSP, resultados correlacionados com as imunomarcações moderada para OCN e leve para OPG para o grupo PO, embora, sem diferenças para RUNX2. Na comparação entre os grupos PO e PHA, nas análises de histometria e microtomografia não houve diferenças entre a formação de tecido conjuntivo, de tecido ósseo e remanescentes de biomateriais, porém, apresentou uma menor densidade de conectividade entre as partículas remanescentes no grupo PO. Na análise de expressão gênica, observamos uma maior expressão no grupo PO para os genes RUNX2, entretanto, sem diferenças para os genes VEGF e IBSP, bem como para as imunomarcações para as proteínas OPN, OCN e RUNX2. **Conclusão:** Por meio das análises realizadas neste estudo, a biocerâmica bifásica Plenum® Osshp não apresentou diferenças em comparação aos demais materiais avaliados, sendo, portanto, considerada uma opção eficaz como substituto ósseo sintético na regeneração óssea.

Palavras Chave: Biocerâmica bifásica. Substitutos Ósseo. Modelos animais.

1 Introdução

Defeitos ósseos críticos são classificados como aqueles em que o reparo ósseo não se completa espontaneamente, havendo necessidade da utilização de enxertos para o preenchimento ou reconstrução e concomitante estimulação da neoformação óssea. As biocerâmicas são uma classe de materiais regenerativos sintéticos desenvolvidos no intuito de servir de arcabouço mineralizado para proliferação de células osteoprogenitoras, principalmente pelo fato de apresentarem uma composição química similar ao tecido ósseo, por serem compostas por hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcicos β -TCP, indicando portanto, sua utilização como substituto ósseo (Nery *et al.*, 1992; Klenke *et al.*, 2003; Geriki *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2013; Ebrahimi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Ebrahimi *et al.*, 2017).

Devido a sua lenta taxa de reabsorção, a HA apresenta deficiências no processo de neoformação óssea, no entanto, é capaz de manter a estrutura e o arcabouço por um período mais duradouro. Por outro lado, o β -TCP apresenta alta solubilidade e rápida reabsorção, favorecendo a neoformação óssea, mas dificultando a manutenção do arcabouço (Einhorn *et al.*, 1995; Gerike *et al.*, 2006; Ebrahimi *et al.*, 2017).

No estudo realizado por Fabris *et al.*, em 2018, que teve por objetivo avaliar potencial osteocondutor do BoneCeramic® em defeitos críticos, de 5mm, realizados em calvária de ratos, comparando ao osso autógeno (controle positivo) ao coágulo (controle negativo), observaram pela análise de histometria, que o defeito preenchido com o biomaterial apresentou uma quantidade de osso neoformado semelhante ao grupo autógeno, em 14 dias, porém, em 28 dias, houve uma maior formação de tecido ósseo com a utilização de osso autógeno. No entanto, o biomaterial apresentou imunomarcações positivas para OCN, RUNX2 e VEGF, bem como uma densidade mineral óssea semelhante ao grupo autógeno, concluindo que a biocerâmica estudada foi favorável para o preenchimento de defeitos ósseos.

Lee *et al.*, em 2013, avaliaram a utilização de uma biocerâmica, composta por β -TCP: HA, na proporção de 60%: 40%, em comparação ao BioOss® em defeitos críticos de 8mm, em calvária de ratos, nos períodos de 4 e 8 semanas. E observaram pelas análises de histologia e microtomografia computadorizada uma melhor neoformação óssea no grupo biocerâmica, com um aumento da neoformação óssea na região central do defeito em 8 semanas, além de apresentar uma maior proporção

de volume ósseo e do número de trabéculas pela análise de microtomografia quando comparado aos defeitos preenchidos por BioOss®, concluindo que a biocerâmica obteve uma formação óssea superior tanto em quantidade quanto em qualidade no modelo animal estudado, sugerindo sua utilização como substituto ósseo.

Ainda não há um consenso sobre a proporção de biocerâmica mais indicada para procedimentos de enxertia óssea, devendo provavelmente tal proporção ser ajustada de acordo com as condições clínicas. Para pacientes que necessitem da manutenção do arcabouço por mais tempo, a proporção de HA deve ser maior do que a de β -TCP e para casos em que já existe um arcabouço e necessitam de uma maior taxa de neoformação a proporção de β -TCP deve ser maior que a de H.A (Ebrahimi *et al.*, 2017).

O Plenum® Osshp, (M3 Health Ind. Com. de Prod. Med. Odont. e Correlatos S.A, Jundiaí, Brasil) é constituída de hidroxiapatita e β -fosfato de tricálcio (70HA: 30 β -TCP). Segundo o fabricante, a macro e microporosidade garantem um crescimento celular osteogênico eficiente, promovendo a regeneração óssea e a adesão celular no sítio do defeito ósseo.

O objetivo desse estudo foi avaliar o processo de reparo ósseo de biocerâmica bifásica, Plenum® Osshp, quanto aos parâmetros de histometria, análises de expressão gênica, imunoistoquímica e de microtomografia computadorizada no preenchimento de defeitos críticos em modelo animal.

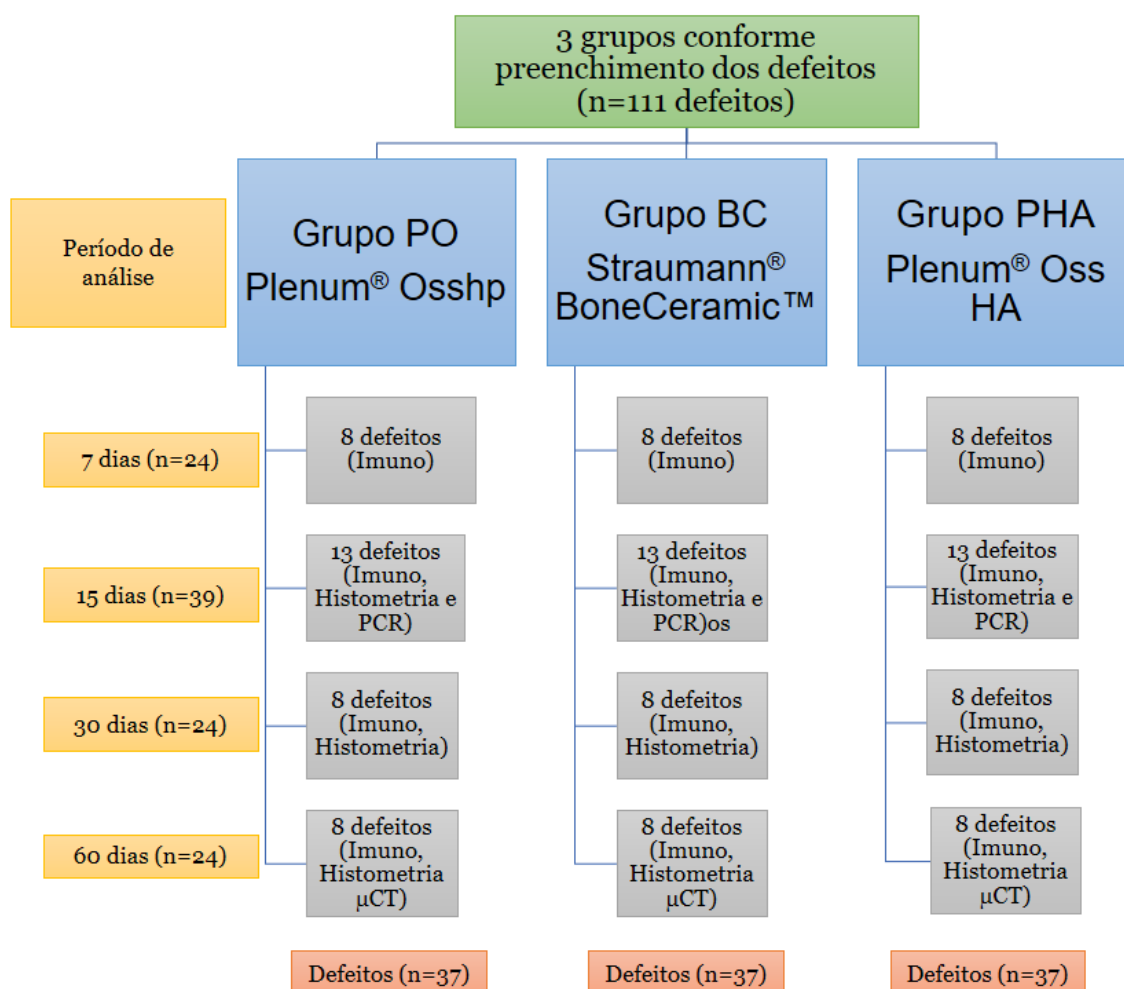
2. Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, com número de registro 43/2017. Os experimentos foram realizados dentro dos padrões estabelecidos pela norma ISO 10993- “*Biological evaluation for medical devices- Part 6: Tests for local effects after implantation*”.

A amostra consistiu de 111 defeitos críticos, confeccionados em calvárias de ratos (*Rattus Norvegicus Holtzman*), adultos, machos, pesando entre 260 e 350 g, com média de 3 meses de vida, fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram mantidos em condições padronizadas, com água e ração *ad libitum* e sob temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos claro/escuro de 12 horas.

Os preenchimentos dos defeitos constituíram os seguintes grupos: Grupo PO-Plenum® Osshp (M3 Health Ind. Com. de Prod. Med. Odont. e Correlatos S.A, Jundiaí, Brasil); Grupo BC- BoneCeramic™ (Straumann®, Basel, Suíça) e Grupo PHA-Plenum Oss HA (M3 Health Ind. Com. de Prod. Med. Odont. e Correlatos S.A, Jundiaí, Brasil). Figura 1.

Figura 1. Fluxograma dos grupos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



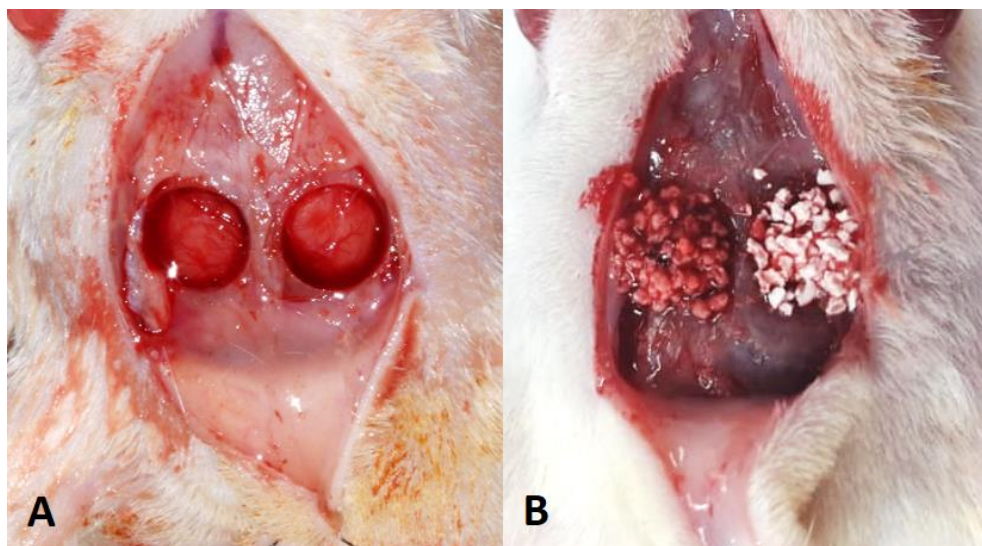
Fonte: Elaboração própria

2.1 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados por meio de administração intramuscular de cloridrato de ketamina, na dose de 25 mg/kg (Syntec - Santana de Parnaíba, SP) e de cloridrato de xilazina, na dosagem de 5 mg/Kg (Syntec - Santana de Parnaíba, SP). Após a anestesia e tricotomia, os animais receberam uma incisão em formato de “V” sobre os ossos parietais, seguido por descolamento. Os defeitos ósseos na calvária dos animais foram confeccionados com o auxílio de uma trefina de 5 mm de diâmetro interno (Ref 103.027, Sistema Neodent, Curitiba, Brasil) sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9%, e consistiu na perfuração em espessura total do osso parietal, mantendo a integridade da dura-máter.

Após o preenchimento dos defeitos, (Figura 2), foram realizadas as suturas com mononylon 5-0 (Ethicon®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil).

Figura 2. (A) Defeitos críticos em calvária, com 5mm de diâmetro interno. (B) defeito do lado direito, grupo 1, preenchido com Plenum® Osshp e defeito do lado esquerdo, com BoneCeramic™. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

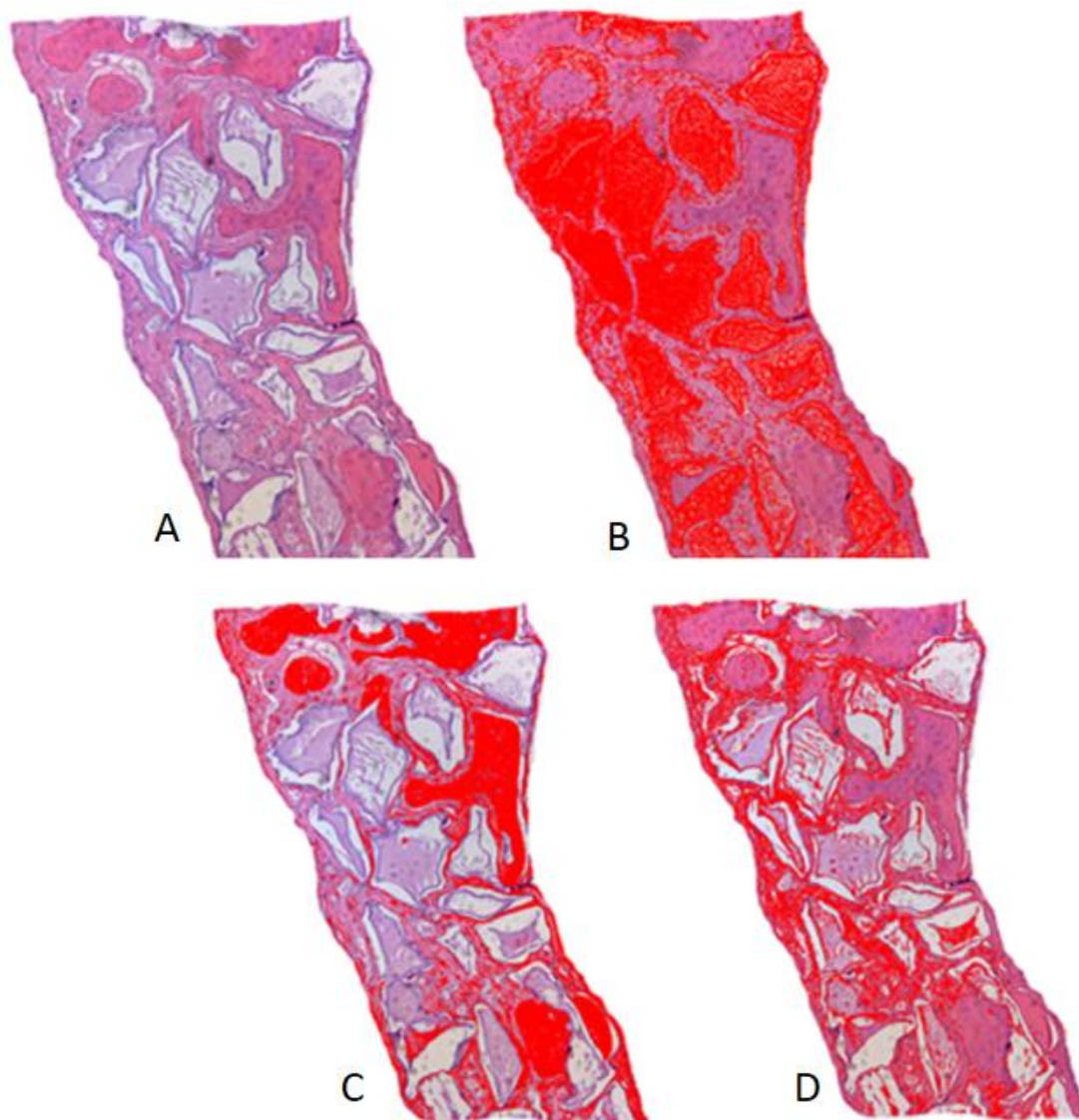
Todos os animais receberam em dose única nos pós-operatório imediato, por via intramuscular Dipirona Sódica D 500 (Zoetis, Campinas, Brasil) e pentabiótico para animais de pequeno porte, 1.200.00UI (Zoetis®, Campinas, Brasil) e evoluíram sem sinais de infecções ou complicações pós-operatórias. A eutanásia dos animais ocorreu por meio de superdosagem de anestésico e foram realizadas nos períodos de 07, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, exceto as amostras para as análises de PCR, que foram adicionadas imediatamente em criotubos e armazenadas em freezer -80°C.

2.2 Análise de Histometria

Após verificada a correta desmineralização das peças, foram obtidos cortes de 6µm de espessura de cada peça, divididos em lâminas com 4 cortes cada, corados por hematoxilina-eosina.

A avaliação histométrica das peças foi realizada utilizando um microscópio de luz DIASTAR (Leica Reichert & Jung Products®, Germany), com objetivas para aumento de 5 vezes. As imagens representativas foram enviadas para um microcomputador, utilizando de uma câmera fotográfica digital (Leica Microsystems® DFC-300-FX – Alemanha), acoplada ao microscópio de luz comum, e salvas sob a extensão TIF. A determinação dos valores foi realizada empregando-se um software analisador de imagens ImageJ FIJI (Broken Symmetry® Software 1.43.76, USA). Um examinador treinado realizou a análise, tendo os cotos ósseos como referências e delimitando o defeito. A área foi delimitada usando o recurso de “mão livre” no próprio software e a área total das amostras foram estabelecidas como 100%. Em seguida, foram mensuradas a quantidade de tecido ósseo, remanescente de biomaterial e tecido conjuntivo por meio da ferramenta de *threshold* de cores, e os espaços vazios foram subtraídos do cálculo quando presentes (Figura 3). A porcentagem de cada componente foi obtida pela média de duplicatas de cada defeito.

Figura 3. Histometria do Grupo Plenum® Osshp, período de 60 dias, ilustrando as mensurações por *Threshold* de cores, evidenciada pela cor vermelha, realizada pelo software ImageJ FIJI®, sendo: A: imagem histológica original, na coloração de HE, sem filtros. B: *Threshold* para remanescente de biomaterial. C: *Threshold* para tecido ósseo. D: *Threshold* para tecido conjuntivo. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



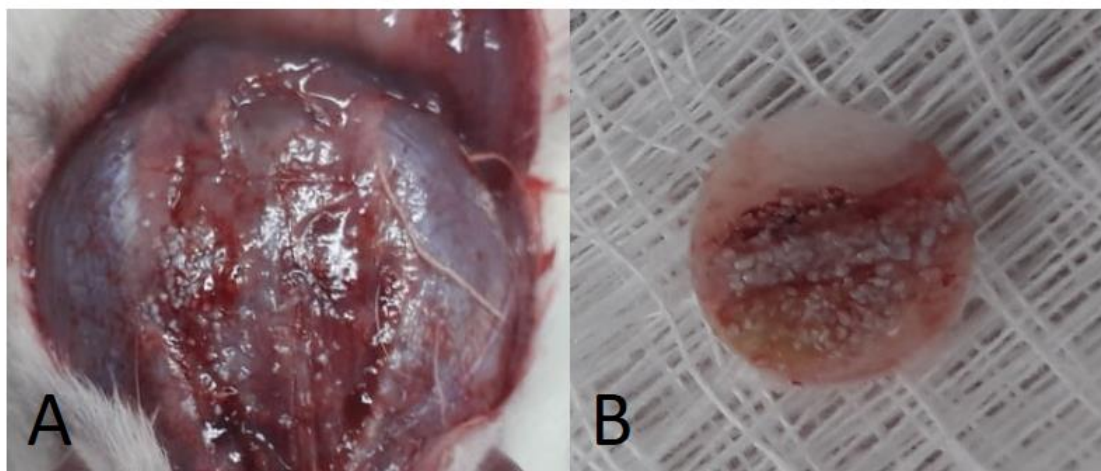
Fonte: Elaboração própria

2.3 Análise de Expressão Gênica

No período de 15 dias, foi coletado o tecido ósseo dos defeitos críticos de 5 animais destinados para a análise da expressão dos genes *Runt-Related transcription factor 2* (RUNX2), *Integrin Binding Sialoprotein* (IBSP) e *Vascular Endotelial Fator* (VEGF) nos grupos PO e BC.

Cada fragmento ósseo foi removido com a utilização de uma trefina de 7mm de diâmetro (Harte®, Ribeirão Preto/SP, Brasil) (Figura 4). A remoção foi realizada sob constante irrigação de uma solução resfriada de tampão fosfato-salino (PBS) e posteriormente acondicionados em criotubos de 2,0ml (Corning®, Nova York, EUA), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em Freezer -80°C (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), para que o RNA total seja isolado com o auxílio do reagente Trizol (Life Technologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A extração do RNA foi realizada através do kit Promega (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)

Figura 4. A). Exposição da região de calvária. B). Fragmento ósseo removido com auxílio de trefina com 7mm. Quirino, L.C, Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

O RNA foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop®2000 (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) e foi confeccionado o cDNA utilizando 1µg de RNA por meio da reação da transcriptase reversa (M-MLV: transcriptase reversa: High capacity (Waltham, Massachusetts, USA). A sequência dos primers foi amplificada e seus produtos foram submetidos a eletroforese com gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo e visualizados utilizando o software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA).

Por fim, o PCR em tempo real foi conduzido com base no sistema StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando o sistema de corantes fluorescentes para detecção SybrGreen (Primer Design Ltd, Southampton, UK) sob as condições cíclicas: 95° durante 10 minutos para a desnaturação primária, e 35 ciclos de 95° por 15 segundos para abertura das fitas e, finalmente, 60° por 60 segundos para anelamento dos primers e extensão dos fragmentos.

A expressão gênica foi calculada por referência à expressão das proteínas ribossomal mitocondrial e normalizada pela expressão gênica dos fragmentos das paredes do defeito no período de 15 dias.

A expressão gênica dos demais grupos foi avaliada em relação à expressão do grupo controle, que neste estudo, foi a grupo PHA, pois faz parte da composição química de ambas biocerâmicas bifásicas, por esse motivo, o grupo da PHA apresenta um valor próximo a 1.0 (valor médio) e representa quantas vezes a expressão do gene analisado foi maior ou menor em relação à expressão do gene do grupo PHA.

2.4 Análise de Imunoistoquímica

As análises de imunoistoquímica foram realizadas por meio da técnica de detecção pela imunoperoxidase no período de 07 dias. Após a desparafinização dos cortes histológicos, a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Em seguida, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6,0) e o bloqueio da biotina endógena por meio de albumina bovina 1% e leite desnatado.

Os anticorpos primários utilizados foram contra as proteínas OCN, OPN e RUNX2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA). O controle negativo foi realizado por meio da omissão de anticorpos primários. Como controle positivo, foi utilizado a cortical hígida do osso parietal fora do defeito, para verificação da efetividade dos anticorpos utilizados. O anticorpo secundário usado foi o anticorpo biotinilado anti-rato (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). A Biotina avidina foi utilizada para amplificar o sinal de imunomarcação e o cromógeno utilizado foi o Diaminobenzidina (Dako, Glostrup, Dinamarca). As amostras foram contra-coradas com solução de Hematoxilina Mayer. As imagens foram obtidas usando uma câmera acoplada ao microscópio de luz (Leica Reichert Diastar Produtos & Jung, Wetzlar, Alemanha).

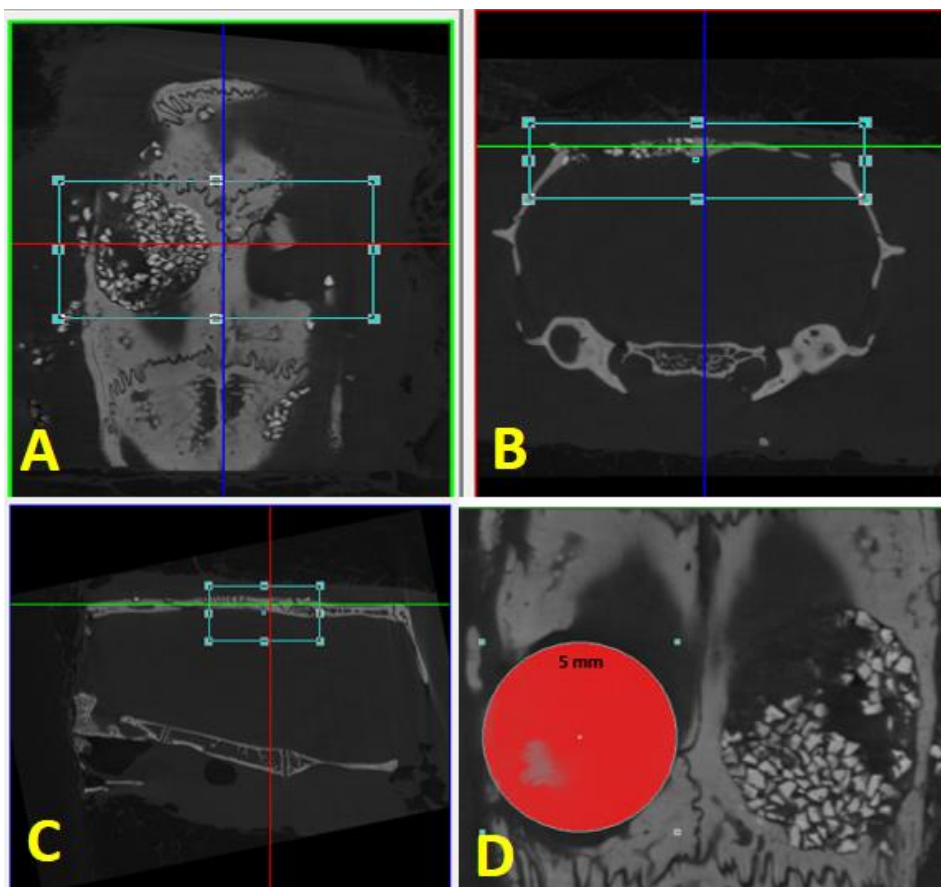
A análise descritiva foi realizada por um único examinador treinado (RO), atribuindo escores para verificar a expressão das proteínas na região dos defeitos ósseos, a saber: (0) sem marcação (0% de células/matriz), (1) leve (<25% de células/matriz), (2) moderado (25-50% de células/matriz) e (3) intenso (>50% de células/matriz).

2.5 Micro-CT

Para a aquisição das imagens foi adotada uma resolução espacial de 12 µm; as imagens foram adquiridas com equipamento modelo Phoenix V |tome| x M Microfocus Scanner (General Electric Company®, Wunstorf, Germany) com ajuste de voltagem de 80 kV. Após as aquisições das imagens, os planos axial, coronal e sagital foram alinhados para identificar visualmente todas as regiões de interesse. Os volumes de interesse (VOIs) foram adquiridos por meio da reconstrução das imagens bidimensionais (2D) e a reconstrução das imagens volumétricas 3D foram obtidas com a utilização do software SkyScan, DataViewer® v. 1.4.1.

No CTAnalyser® (SkyScan v. 1.11.8.0), uma circunferência de 5,0mm; foi posicionada no centro das áreas dos defeitos e uma espessura de 1,0mm foi considerada para análise. Foi adotado um *threshold* de 105 (máximo) e 75 (mínimo) para a avaliação do tecido ósseo e de 255 (máximo) e 105 (mínimo) para a avaliação dos materiais regenerativos. Os valores dos parâmetros para os materiais regenerativos foram subtraídos dos valores obtidos para o tecido ósseo, para separar os volumes dos materiais regenerativos remanescentes do tecido ósseo neoformado (Figura 5).

Figura 5. A- Reconstrução 3D, Plano axial. B- Plano coronal. C- Plano sagital. D- Delimitação da área de interesse, com mesmo diâmetro do defeito de 5mm. Quirino, L.C, Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

Foram utilizados os seguintes parâmetros para a análise dimensional da microarquitetura do osso trabecular, baseado na nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone Mineral Research (2010)*: *Percent bone volume (BV/TV)*, *Trabecular number (Tb.N)*, *Trabecular separation (Tb.Sp)*, *Trabecular thickness (Tb.Th)* e: *Connectivity density (Conn.Dn)*.

2.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram previamente submetidos a teste de normalidade e homogeneidade de variância para seleção dos testes aplicados. Para a comparação dos dados, foi considerado um poder de estudo de 80% e um erro alfa de 5%.

Para as avaliações de histometria, todos os dados passaram no teste de normalidade de Shapiro-Wilk e homocedasticidade de Levene, desta forma, foi

utilizado o teste ANOVA two-way com pós teste de Tukey para as comparações entre os grupos e para a variante tempo (15, 30 e 60 dias)

Para as análises de microtomografia computadorizada, os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e homocedasticidade de Levene, com mais de 90% dos dados apresentando distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$), portanto a comparação entre grupos foi realizada com testes paramétricos. A comparação dos parâmetros no *threshold* de tecido ósseo neoformado com teste ANOVA One-way, com pós teste de Tukey. Na avaliação do *threshold* de remanescente de biomaterial, os dados também respeitaram a distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e foram analisados por meio do teste ANOVA one-way, com pós teste de Tukey.

A análise estatística foi realizada comparando os valores médios e de desvio padrão (SD) entre os grupos. Os dados das avaliações para RUNX2, VEGF, IBSP foram submetidos ao pressuposto de normalidade e homogeneidade de variâncias por meio dos Testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente e apresentaram valores de $p > 0,05$ para normalidade e de $p < 0,05$ para a homogeneidade.

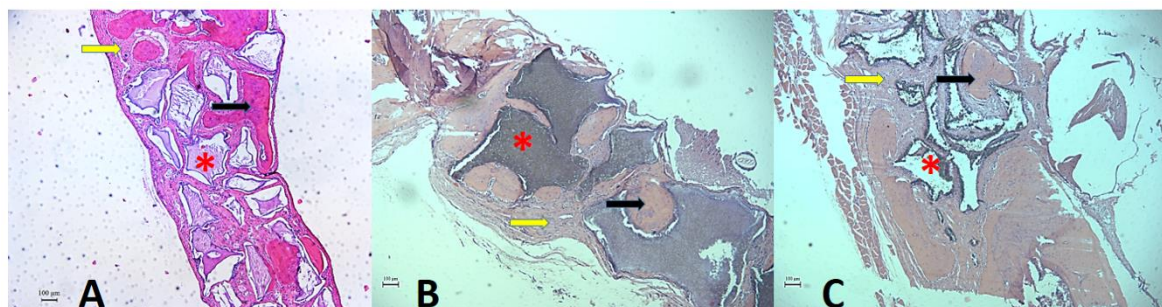
3 Resultados

3.1 Análise Histométrica

Foram analisados quantitativamente em porcentagem volumétrica, o tecido ósseo neoformado, tecido conjuntivo e remanescente dos biomateriais regenerativos (Tabela 1). O grupo PO não apresentou diferenças estatisticamente significante para o grupo BC na formação de tecido conjuntivo e tecido ósseo ($p > 0,05$) para todos os períodos avaliados. Quando avaliado em relação ao remanescente de biomaterial, o grupo PO apresentou no período de 60 dias, uma maior porcentagem ($0,78 \pm 0,32$) em relação ao grupo BC ($0,4 \pm 0,05$).

Quando comparamos PO com o grupo PHA, observamos uma maior porcentagem de tecido conjuntivo no grupo PO apenas no período de 15 dias ($0,82 \pm 0,43$ versus $0,48 \pm 0,11$), sendo semelhante entre si nos demais períodos, assim como também não houve diferença estatisticamente significante em relação ao remanescente de biomaterial e de tecido ósseo neoformado para todos os períodos avaliados ($p > 0,05$). Figura 6.

Figura 6. Cortes histológicos em microscopia de luz, aumento de 5x, no período de 60 dias de cada condição experimental a saber: asterisco: biomaterial remanescente, seta preta: tecido ósseo; seta amarela: tecido conjuntivo. A). Grupo Plenum® Oss HA. B). Grupo Plenum® Ossshp C). Straumann® BoneCeramic™. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

Tabela 1. Análise histométrica de defeitos ósseos preenchidos com diferentes biomateriais. Quirino, L. C, Araraquara, 2022.

Tecido Conjuntivo			
	G1 Plenum® Ossshp	G2 Straumann® BoneCeramic™	G3 Plenum® Oss HA
15 dias	0,82 (0,43)b	0,87 (0,5)b	0,48 (0,11)a
30 dias	0,44 (0,17)a	0,47 (0,26)a	0,55 (0,14)a
60 dias	0,80 (0,18)b	0,75 (0,27)b	0,57 (0,29)b

Tecido Ósseo Neoformado			
	G1 Plenum® Ossshp	G2 Straumann® BoneCeramic™	G3 Plenum® Oss HA
15 dias	0,64 (0,3)a	0,50 (0,19)a	0,22 (0,11)a
30 dias	0,45 (0,11)a	0,28 (0,06)a	0,37 (0,42)a
60 dias	0,64 (0,3)a	0,37 (0,21)a	0,34 (0,15)a

Biomaterial Remanescente			
	G1 Plenum® Ossshp	G2 Straumann® BoneCeramic™	G3 Plenum® Oss HA
15 dias	0,68 (0,3)ab	0,64 (0,1)ab	0,83 (0,27)a
30 dias	0,56 (0,17)a	0,40 (0,11)a	0,63 (0,17)a
60 dias	0,78 (0,32)a	0,40 (0,05)b	0,64 (0,18)ab

*Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os Grupos.

Fonte: Elaboração própria

3.2 Análise de Expressão Gênica

3.2.1. RUNX2

O grupo PO (2.34 ± 0.13) apresentou uma menor expressão de RUNX2 em relação ao BC (2.93 ± 0.18), porém, apresentou uma maior expressão quando comparado ao PHA (1.40 ± 0.33). Tabela 2.

Tabela 2 - Análise da expressão gênica de RUNX2 para a análises dos biomateriais regenerativos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

RUNX2		
PO	BC	PHA
$2,34 \pm 0.13^c$	$2,93 \pm 0.18^b$	$1,40 \pm 0.33^a$

Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos (ausência de notação pressupõe igualdade estatística). ANOVA One-way, pós-teste de Dunnett e pós teste de Tukey. Fonte: Elaboração própria

3.2.2. VEGF

Foi observada uma menor expressão de VEGF no grupo PO (3.45 ± 0.21) em relação ao grupo BC (4.93 ± 0.64), porém, sem diferenças estatísticas ao grupo PHA.

Tabela 3.

Tabela 3 - Análise da expressão gênica de VEGF para a análises dos biomateriais regenerativos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

VEGF		
PO	BC	PHA
$3,45 \pm 0.21^a$	$4,93 \pm 0.64^b$	$3,06 \pm 0.79^a$

Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos (ausência de notação pressupõe igualdade estatística). ANOVA One-way, pós-teste de Tukey. Fonte: Elaboração própria.

3.2.3. IBSP

O grupo PO (5.66 ± 0.32) apresentou uma maior expressão do gene da sialoproteína óssea quando comparado com o grupo BC (2.79 ± 0.82), porém, sem diferenças em relação ao grupo PHA. Tabela 4.

Tabela 4 - Análise da expressão gênica de IBSP para a análises dos biomateriais regenerativos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

	IBSP	
PO	BC	PHA
5,66±0.32 ^a	2,79±0.82 ^b	5,57±2.02 ^a

Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos (ausência de notação pressupõe igualdade estatística). ANOVA One-way, pós-teste de Dunnett e pós teste de Tukey. Fonte: Elaboração própria.

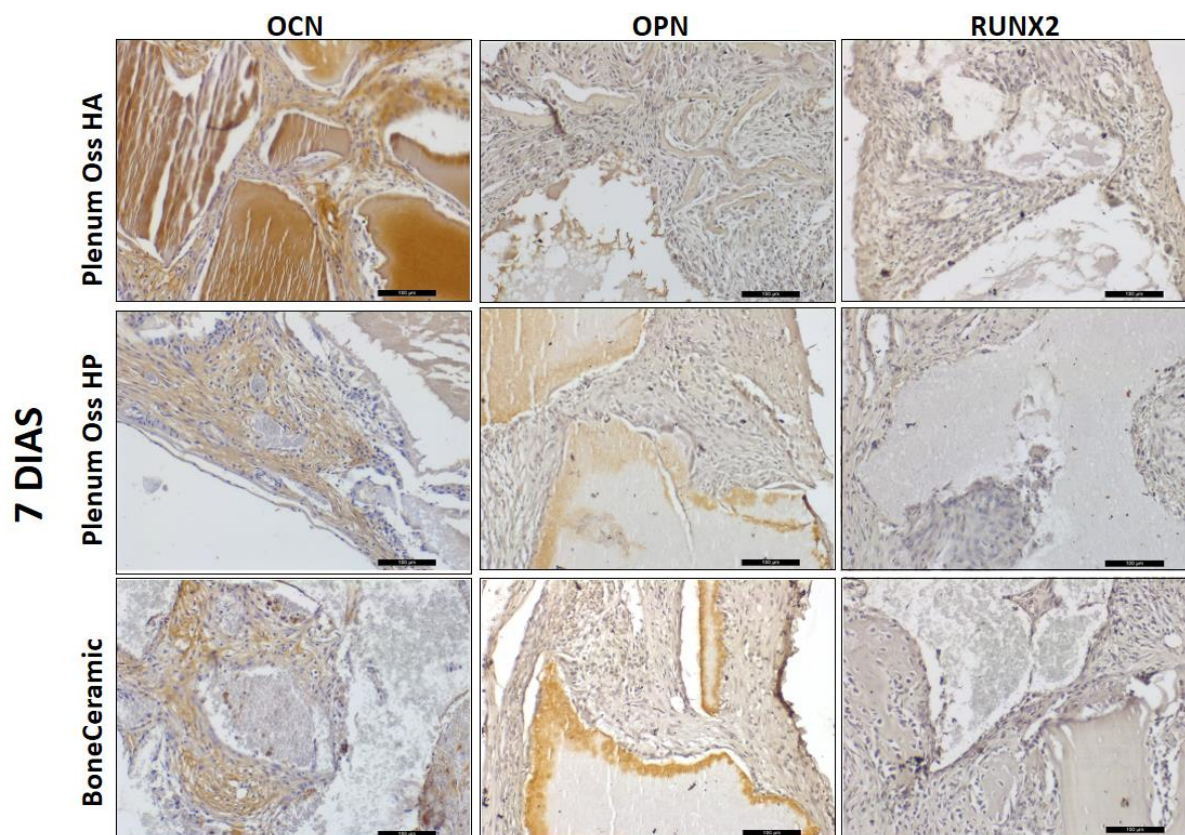
3.4 Análise de Imunoistoquímica

As marcações para RUNX2 foram observadas em células caracterizadas como pré-osteoblastos e osteoblastos jovens, bastante próximos dos biomateriais e com um padrão moderado (2) para todos os grupos.

A presença de osteopontina, apresentou-se imunomarcada tanto nas células como na matriz extracelular. Com relação a presença da osteopontina nas células osteoblásticas, foi verificada a presença de marcação leve (1) para a PO assim como para o PHA. Quanto ao BC, a marcação foi moderada (2) junto às células osteoblásticas.

Para osteocalcina, foi possível observar a presença de marcação moderada (2) para os grupos PHA e PO. No grupo PHA, foram observadas áreas de matriz óssea mineralizada, marcadas positivamente para a osteocalcina. No grupo PO, observou-se moderada (2) marcação para osteocalcina nas células osteoblásticas assim como na matriz extracelular não mineralizada. Quanto ao BC, observou-se moderada (2) marcação de osteocalcina na matriz extracelular não mineralizada, porém com menor evidenciação do que o grupo PO. Figura 7.

Figura 7. Painel imunoistoquímico evidenciando as imunomarcações das proteínas OCN, OPN e RUNX2 para todos os grupos no período de 7 dias. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

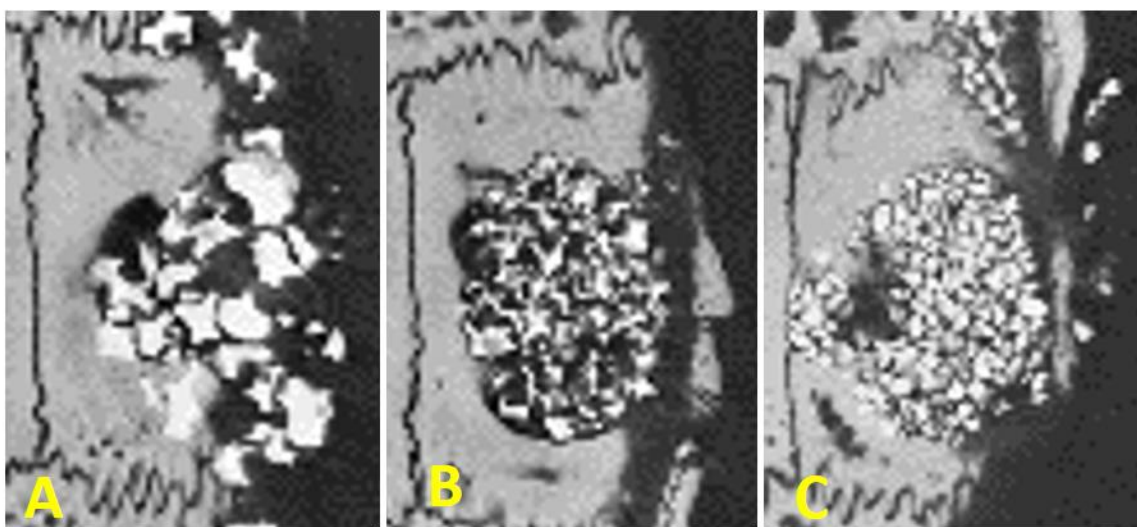
3.4 Análise de Micro –CT

Na avaliação do *threshold* de tecido ósseo neoformado aos 60 dias, no grupo PO houve uma formação de tecido mineralizado semelhante ao BC em proporção de volume ósseo, número, separação e espessura de trabéculas, porém, com uma menor densidade de conexões entre elas ($26,74 \pm 24,56$ versus $69,12 \pm 60,67$). Quando avaliado o *threshold* para os remanescentes de biomaterial, não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao BC para os parâmetros BV/TV, TbN, TbSp e ConnDn, divergindo apenas por apresentar uma maior espessura das trabéculas desses remanescentes no grupo PO ($0,32 \pm 0,05$) em relação ao BC ($0,16 \pm 0,03$). Figura 8.

Na comparação entre os grupos PO e PHA, para a avaliação do *threshold* de tecido ósseo neoformado, não apresentou diferenças estatísticas significativas para todos os parâmetros analisados ($p > 0,05$). Para a avaliação do *threshold* de biomateriais remanescentes, também observamos semelhanças para a proporção de volume ósseo, número, espessura e separação entre as trabéculas remanescentes

($p > 0,05$), entretanto, a densidade de conexões foi menor no grupo da PO ($4,64 \pm 2,8$) versus PHA ($13,14 \pm 7,79$). Tabelas 5 e 6.

Figura 8. Imagens obtidas pela microtomografia digital computadorizada no plano axial evidenciando o tecido ósseo permeando o remanescente de biomateriais. A) Grupo 1 Plenum® Osshp; B) BoneCeramic® e C) Plenum® Oss HA. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

Tabela 5. Parâmetros microtomográficos para o *threshold* de tecido mineralizado nos diferentes grupos de análise. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

Parâmetros osso	G1 Plenum® Oss	G2	G3 Plenum®
		Straumann® BoneCeramic TM	Oss HA
BV/TV	$10,93 \pm 3,00a$	$14,26 \pm 4,19a$	$16,82 \pm 2,82a$
Tb.N	$1,58 \pm 0,35a$	$2,12 \pm 0,61a$	$2,52 \pm 0,84a$
Tb.Th	$0,07 \pm 0,02a$	$0,07 \pm 0,02a$	$0,08 \pm 0,04a$
Tb.Sp	$0,47 \pm 0,12a$	$0,38 \pm 0,15a$	$0,36 \pm 0,05a$
Conn.dn	$26,74 \pm 24,56a$	$69,12 \pm 60,67b$	$25,19 \pm 15,25a$

Fonte: Elaboração própria

Tabela 6. Parâmetros microtomográficos para o *threshold* de biomaterial remanescente nos diferentes grupos de análise. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

Parâmetros osso	G1 Plenum® Oss	G2 Straumann® BoneCeramic TM	G3 Plenum® Oss HA
BV/TV	25,63 ± 9,13a	15,8 ± 6,7a	22,14 ± 14,51a
Tb.N	0,80 ± 0,21a	0,96 ± 0,36a	0,95 ± 0,55a
Tb.Th	0,32 ± 0,05a	0,16 ± 0,03b	0,20 ± 0,08ab
Tb.Sp	0,55 ± 0,13a	0,48 ± 0,15a	0,51 ± 0,2a
Conn.dn	4,64 ± 2,8a	8,80 ± 2,7a	13,14 ± 7,79b

Fonte: Elaboração própria

4. Discussão

O objetivo desse estudo, foi avaliar em modelo animal, o processo de reparo ósseo de uma biocerâmica bifásica, composta por 70 HA: 30 β -TCP, por meio das análises histométrica, da expressão gênica, imunoistoquímica e microtomografia computadorizada (Anavi *et al.*, 2011; Luvizuto *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2020).

Com a finalidade de definir a melhor proporção entre HA e β -TCP para os procedimentos de enxertia, novos produtos são produzidos e testados em estudos que visam determinar sua utilização clínica com maior previsibilidade e segurança (Kim *et al.*, 2016; Ebrahimi *et al.*, 2017; Macedo *et al.*, 2018). No nosso estudo foi utilizado um biomaterial como controle positivo, já amplamente empregado na área de cirurgia e implantodontia. Neste estudo, quando comparamos o tecido mineralizado formado nos grupos PO e BC, nas análises de histometria e de microtomografia, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o volume de tecido mineralizado formado, sendo semelhantes também quanto ao número, à espessura e separação entre as trabéculas, diferindo apenas no parâmetro densidade de conectividade quando em comparação com o comparador, indicando assim, que existe uma menor resistência desse tecido ósseo neoformado. Uma hipótese para esse resultado, está relacionado com a diferença entre as proporções dos seus componentes, sendo que o material testado apresenta uma maior proporção de HA em relação ao comparador (70:30 PO versus 60:40 em BC); apesar da HA ter uma composição química semelhante ao osso, apresenta maior fragilidade e menor potencial de remodelação devido a sua baixa taxa de reabsorção após a inserção (Lee *et al.*, 2013).

No estudo realizado por Lee *et al.*, em 2013, os autores avaliaram uma cerâmica bifásica composta de 60 β -TCP : 40 HA versus BioOss[®], em defeitos críticos de 8mm na calvária de ratos, e observaram pela análise de microtomografia computadorizada, um aumento na relação BV/TV no grupo da biocerâmica bifásica quando comparado com o BioOss[®], bem como, um maior TbN e TbTh nos períodos avaliados de 4 e 8 semanas, porém, sem diferenças estatística significante; na análise histológica, foi observada uma neoformação óssea marginal para ambos os grupos no período de 4 semanas, porém, foi maior no grupo da biocerâmica, em 8 semanas. Concluíram que, a melhor neoformação óssea obtida pela biocerâmica bifásica

provavelmente esteja relacionada com a superioridade da osteocondutividade e osteoindutividade encontrada na composição bifásica da biocerâmica em comparação ao BioOss®, de origem bovina, indo de encontro com os resultados do nosso estudo, que também mostrou semelhanças para TbN, TbTh e para a formação de tecido ósseo na análise de histometria entre as duas biocerâmicas, considerando que ambas são de origem sintética.

Takauti *et al.*, em 2014, compararam BioOss®, Endobon® e BoneCeramic® em defeitos críticos na calvária de coelhos, e observaram que o biomaterial regenerador sintético apresentou maiores índices de tecido ósseo neoformado quando comparado aos biomateriais de origem bovina, como o Bioss® e o Endobon®. No presente estudo, foi observado que o grupo PO obteve resultados semelhantes ao controle positivo (grupo BC).

Ainda na análise de tecido ósseo pela expressão gênica, observamos uma menor expressão dos genes relacionados à diferenciação osteoblástica (RUNX2) no grupo PO em relação ao grupo BC, indicando uma menor expressão para a neoformação óssea, uma vez que a expressão de RUNX2 está presente nos pré-osteoblastos, sendo portanto, uma característica importante para a neoformação óssea, porém, foi observado que, uma vez sintetizado, esse novo tecido ósseo, apresenta uma maior mineralização, com uma maior expressão para IBSP. Para a angiogênese, também foi observado uma menor expressão no grupo PO em relação ao BC, resultado obtido também por Chen *et al.*, em 2014, ao avaliar a angiogênese em biocerâmicas bifásicas com diferentes proporções de HA e β -TCP em ratos, concluindo que, quanto maior a fase de β -TCP, maior a expressão para VEGF, induzindo o aumento da neovascularização da biocerâmica bifásica, corroborando com o resultado deste estudo, que por apresentar uma menor fase de β -TCP (30%) no grupo PO, apresentou uma menor expressão de VEGF quando comparado ao grupo CS, que apresenta um maior percentual de β -TCP (40%) (Chen *et al.*, 2014; Macedo *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2019).

A análise imunoistoquímica realizada precocemente no período de 7 dias é de suma importância, pois demonstra a fase inicial do estágio reparacional do defeito, período no qual há uma maior quantidade de células que serão responsáveis pela síntese das proteínas que participarão das respostas reparacionais, portanto, passível de avaliar a resposta celular frente aos estímulos promovidos pelos biomateriais. Uma importante correlação entre as proteínas OPN, marcador precoce de mineralização e

OCN, um marcador tardio da mineralização e presente neste estudo, foi que o grupo PO apresentou um estágio mais avançado de mineralização final da matriz óssea em relação ao grupo BC, resultado corroborado também pela análise de expressão gênica, com uma maior expressão para IBSP, embora com uma imunomarcagem de RUNX2 semelhante em pré-osteoblastos e osteoblastos jovens entre os dois grupos (Nagata *et al.*, 2009).

Quando comparado o tecido ósseo formado entre os grupos PO e PHA, podemos observar que ao longo dos períodos, essa neoformação óssea foi semelhante entre ambos, tanto para a análise de histometria quanto para todos os parâmetros da análise microtomográfica (BV/TV, TbN, TbSp, TbTh e ConnDn), sugerindo que a presença do β -TCP presente no grupo PO, não diminuiu a neoformação óssea. Este resultado também foi verificado por Kim *et al.*, em 2016, utilizando defeitos críticos de 8mm de diâmetro em calvária de ratos, na análise de histometria para quantidade de tecido ósseo neoformado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no período de 8 semanas entre os grupos Bongros® (HA) e BioOss®, indicando que a hidroxiapatita pura, pode trazer resultados tão satisfatórios quanto aos demais materiais, seja associada ao β -TCP ou enxerto de origem bovina (Kim *et al.*, 2016).

Ao avaliar a expressão gênica verificou-se que o grupo PO apresentou uma maior expressão para a diferenciação dos pré-osteoblasto em osteoblastos (RUNX2) em relação ao grupo PHA, indicando uma maior expressão para a neoformação óssea, porém, sem diferenças estatísticas para a angiogênese e a mineralização da matriz óssea, resultados que corroboram com os achados pela imunomarcagem semelhante pelas proteínas OPN X OCN entre os dois grupos, indicando assim, uma maior mineralização da matriz óssea pela imunomarcagem moderada de OCN, mas, com imunomarcagens semelhantes entre si nos pré-osteoblastos e osteoblastos jovens. Embora com uma menor resistência mecânica que a HA, o β -TCP devido a sua taxa de biodegradação ser maior, favorece o crescimento ósseo ao redor do arcabouço fornecido pela HA, justificando uma maior expressão de RUNX2 pelo grupo PO (Nagata *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2020).

Um ponto muito importante a ser analisado diz respeito ao remanescente de biomaterial. Os substitutos ósseos sintéticos devem apresentar um grau controlado de reabsorção, como ocorre nas biocerâmicas bifásicas, pelo equilíbrio entre a rápida reabsorção do β -TCP e em menor taxa pela na HA, evitando que o biomaterial seja

completamente reabsorvido antes que ocorra a neoformação óssea, ou permaneça por mais tempo que o necessário, prejudicando a substituição por osso neoformado (Lee *et al.*, 2013). No presente estudo, ao compararmos os remanescentes do grupo PO ao do grupo BC pela análise de microtomografia computadorizada, observamos volumes semelhantes, assim como para o número, separação e densidade de conectividade dessas partículas, porém, com uma maior espessura dos remanescentes no grupo PO. Entretanto, os achados histológicos evidenciaram uma maior quantidade de biomaterial remanescente do grupo PO apenas no período de 60 dias. Nevins *et al.*, em 2013, ao avaliarem diferentes formulações de biocerâmicas bifásicas na reconstrução de defeitos ósseos em modelo animal, observou que os grupos que apresentavam maiores proporções de HA, também apresentavam maior quantidade de remanescente de biocerâmica. Esses resultados sugerem que, pela diferença no tamanho dos poros e na proporção entre elas, no qual o grupo PO, por apresentar uma maior proporção de HA e partículas maiores, necessita de um maior tempo para ser reabsorvido, apresentando uma partícula de biomaterial remanescente com maior espessura do que as do grupo BC (Nevins *et al.*, 2013).

Quando a comparação foi realizada com o grupo PHA, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos pela análise de histometria, assim como não houve diferenças na análise de microtomografia para os parâmetros BV/TV, TbN, TbSp e TbTh dos remanescentes de ambos grupos, porém, o grupo PO apresentou uma menor densidade de conexões entre seus remanescentes, sendo a hipótese mais provável, relacionada a rápida reabsorção do β -TCP presente na composição de PO, gerando maior quantidade de microlacunas, e consequentemente, uma menor densidade de conexões. Esses resultados vão de encontro aos achados de Bouler *et al.*, em 2017, que também observaram que a solubilidade influencia o padrão de reabsorção osteoclástica em termos de forma e distribuição das lacunas de reabsorção, sendo estas descontínuas, grandes e formando pequenas ilhas na presença de β -TCP puro, semelhante ao osso medular na proporção de 75 β -TCP (Bouler *et al.*, 2017).

Apesar do estudo ter sido realizado em modelo animal, o modelo em roedores apresenta características fisiológicas semelhantes na remodelação óssea em comparação com a fisiologia óssea em humanos. Frente a esse fato, os excelentes resultados obtidos, conferem segurança e previsibilidade para aplicação clínica da biocerâmica Plenum® Osshp como substituto ósseo sintético.

5 Conclusão

O Plenum® Osshp, demonstrou ser eficaz no processo de reparo ósseo, além de preencher com maior facilidade os defeitos críticos, sendo semelhante ao controle comercial, sendo considerado uma opção eficaz como substituto ósseo sintético na clínica em implantodontia.

AGRADECIMENTOS

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

Os autores agradecem à empresa M3 Health® pela doação dos biomateriais e suporte no presente trabalho.

Nota*: O presente trabalho se baseou na tese de doutorado da aluna Lilian Caldas Quirino, do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia - Campus de Araraquara.

6 Referências

1. Anavi Y, Avishai G, Calderon S, Allon DM. Bone remodeling in onlay beta-tricalcium phosphate and coral grafts to rat calvaria: microcomputerized tomography analysis. J Oral Implantol. 2011 Aug;37(4):379-86. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-09-00128.1. Epub 2010 Jun 16. PMID: 20553149.
2. Bouler JM, Pilet P, Gauthier O, Verron E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. Acta Biomater. 2017 Apr 15; 53: 1-12. doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.076. Epub 2017 Jan 31. PMID: 28159720.
3. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. J Bone Miner Res. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141. PMID: 20533309
4. Chen Y, Wang J, Zhu XD, Tang ZR, Yang X, Tan YF, Fan YJ, Zhang XD. Enhanced effect of β -tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: in vitro and in vivo evidence. Acta Biomater. 2015 Jan; 11:435-48. doi: 10.1016/j.actbio.2014.09.028. Epub 2014 Sep 22. PMID: 25246313.

5. Ebrahimi M, Pripatnanont P, Suttapreyasri S, Monmaturapoj N. In vitro biocompatibility analysis of novel nano-biphasic calcium phosphate scaffolds in different composition ratios. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2014;102(1):52–61
6. Ebrahimi M, Botelho MG, Dorozhkin S V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Mater Sci Eng C.* 2017; 71: 1293–312
7. Einhorn TA. Enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1995; 77: 940 – 56
8. Fabris ALDS, Faverani LP, Gomes-Ferreira PHS, Polo TOB, Santiago-Júnior JF, Okamoto R. Bone repair access of BoneCeramic™ in 5-mm defects: study on rat calvaria. *J Appl Oral Sci.* 2018 Jan 15;26: e20160531. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0531. PMID: 29340480; PMCID: PMC5777426.
9. Ge R, Xun C, Yang J, Jia W, Li Y. In vivo therapeutic effect of wollastonite and hydroxyapatite on bone defect. *Biomed Mater.* 2019 Oct 8;14(6):065013. doi: 10.1088/1748-605X/ab4238. PMID: 31491772
10. Gerike W, Bienengräber V, Henkel KO, Bayerlein T, Proff P, Gedrange T, et al. The manufacture of synthetic non-sintered and degradable bone grafting substitutes. *Folia Morphol (Warsz).* 2006;65(1):54–5
11. Kim RW, Kim JH, Moon SY. Effect of hydroxyapatite on critical-sized defect. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2016 Jul 5;38(1):26. doi: 10.1186/s40902-016-0072-2. PMID: 27441185; PMCID: PMC4932121.
12. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2008;85(3):777-786
13. Lee JH, Ryu MY, Baek H-R, Lee KM, Seo J-H, Lee H-K. Fabrication and Evaluation of Porous Beta-Tricalcium Phosphate/Hydroxyapatite (60/40) Composite as a Bone Graft Extender Using Rat Calvarial Bone Defect Model. *Sci World J.* 2013; 2013:1–9
14. Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials.* 2011 May;32(15):3855-61. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.076. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21376389.
15. Macedo RM, Lacerda SA, Okamoto R, Shahdad S, Brentegani LG. Vital Bone Formation After Grafting of Autogenous Bone and Biphasic Calcium Phosphate Bioceramic in Extraction Sockets of Rats: Histological, Histometric, and Immunohistochemical Evaluation. *Implant Dent.* 2018 Dec;27(6):615-622. doi: 10.1097/ID.0000000000000815. PMID: 30188365
16. Nagata M, Messori M, Okamoto R, Campos N, Pola N, Esper L, Sbrana M, Fucini S, Garcia V, Bosco A. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size

- defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone*. 2009 Aug;45(2):339-45. doi: 10.1016/j.bone.2009.04.246. Epub 2009 May 3. PMID: 19410024.
17. Nevins M, Nevins ML, Schupbach P, Kim SW, Lin Z, Kim DM. A prospective, randomized controlled preclinical trial to evaluate different formulations of biphasic calcium phosphate in combination with a hydroxyapatite collagen membrane to reconstruct deficient alveolar ridges. *J Oral Implantol*. 2013 Apr;39(2):133-9. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-12-00185. PMID: 23611676.
 18. Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects. *J Periodontol*. 1992; 63:729–35
 19. Takauti CA, Futema F, Brito Junior RB, Abrahão AC, Costa C, Queiroz CS. Assessment of bone healing in rabbit calvaria grafted with three different biomaterials. *Braz Dent J*. 2014 Sep-Oct;25(5):379-84. doi: 10.1590/0103-6440201302383. PMID: 25517771
 20. Wei S, Ma JX, Xu L, Gu XS, Ma XL. Biodegradable materials for bone defect repair. *Mil Med Res*. 2020 Nov 10;7(1):54. doi: 10.1186/s40779-020-00280-6. PMID: 33172503; PMCID: PMC7653714
 21. Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancret F, Bouler JM. Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomater*. 2014;10(3):1035–49

3.2 Publicação 2

AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE UMA NOVA BIOCERÂMICA DE β FOSFATO TRICÁLCICO. AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA, MICROTOMOGRÁFICA, EXPRESSÃO GÊNICA E IMUNOISTOQUÍMICA.

Lilian Caldas QUIRINO^a, Pedro Henrique de Azambuja CARVALHO^a, Luiz Henrique Soares TORRES^a, Paula Buzo FRIGÉRIO^b, Roberta OKAMOTO^b, Marisa Aparecida Cabrini GABRIELLI^a, Valfrido Antonio PEREIRA-FILHO^a

^a Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara, Araraquara, Brasil.

^b Departamento de Ciências Básicas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Araçatuba, Brasil.

Palavras-chave: β -fosfato tricálcico. Substitutos Ósseos. Modelos animais.

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

Endereço completo do autor para correspondências:

Lilian Caldas Quirino

Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, Brasil.

Rua Humaitá, 1680

CEP 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brasil

E-mail: lc.quirino@unesp.br

Artigo formatado de acordo com as normas para publicação no periódico Clinical Oral Implants Research – Qualis CAPES A1 – Fator de Impacto 3.825 ISI Journal Citation Reports © Ranking:2018:5/91 (Dentistry, Oral Surgery & Medicine)

RESUMO

Introdução: A utilização de substitutos ósseos sintéticos, como o β -fosfato tricálcico (β -TCP), com propriedades osteocondutoras e uma boa bioabsorvibilidade, é uma opção viável e segura para utilização na regeneração óssea em implantodontia, diminuindo a necessidade de utilização de osso autógeno e de biomateriais de origem animal. **Objetivo:** Avaliar o reparo ósseo, em defeitos críticos na calvária de ratos, de uma nova biocerâmica, a base de β -fosfato tricálcico (Plenum® Oss β -TCP).

Materiais e métodos: Foram confeccionados 98 defeitos críticos em calvária de ratos, divididos em 3 grupos: Grupo PO, Plenum® Oss β -TCP; Grupo CS Cerasorb® e um grupo GC, controle negativo preenchido com coágulo sanguíneo. A eutanásia ocorreu nos períodos de 07, 15, 30 e 60 dias após as cirurgias. As amostras foram submetidas às análises de histometria, microtomografia (Micro CT), expressão gênica (RUNX2, IBSP e VEGF) e imunoistoquímica (OCN, OPG e RANKL). **Resultados:** A análise histométrica não evidenciou diferenças na formação de tecido conjuntivo e tecido ósseo no grupo experimental (PO) em relação aos grupos CS e CG, porém foi verificado uma maior quantidade de biomaterial remanescente no grupo teste (PO), em relação ao grupo CS, nos períodos de 15 e 60 dias. Contudo, não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) para todos os parâmetros avaliados na Micro CT. Os grupos β -TCP (PO e CS) foram comparados entre si, na análise de expressão gênica, sendo verificado que o grupo PO apresentou uma maior expressão para os genes RUNX2 e IBSP, e semelhante para VEGF. A imunomarcacão foi moderada para as 3 proteínas avaliadas (OCN, OPG e RANKL) no grupo teste (PO), já no grupo CS as imunomarcacões foram leve para OCN, moderada para OPG e intensa para a proteína RANKL. Evidenciando que no grupo PO, ocorreu um equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, demonstrando um meio celular mais favorável para regeneração óssea. **Conclusão:** Em defeitos críticos na calvária de ratos, o Plenum® Oss β -TCP, dentro dos parâmetros avaliados, não apresentou diferenças estatísticas na comparação com o material comparador. Contudo, as condições celulares iniciais foram mais favoráveis para o material teste.

Palavras Chave: β -fosfato tricálcico. Substituto Ósseo. Modelos Animais.

1. Introdução

O processo de regeneração do tecido ósseo demanda a presença de células osteogênicas progenitoras, sinalização osteoindutora, matriz osteocondutiva e adequado aporte sanguíneo, sendo esse processo mais difícil em defeitos críticos, nos quais essa regeneração não ocorre completamente de forma espontânea, necessitando, portanto, da utilização de enxertos (Hing *et al.*, 2004; Klenke *et al.*, 2008).

O padrão ouro para enxertia é o osso autógeno, devido às suas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, porém, devido a sua perda volumétrica ser imprevisível, somada à necessidade de um procedimento cirúrgico adicional para obtenção, além da dificuldade de adaptação ao leito receptor e alto risco de complicações na área doadora, os biomateriais tornaram-se uma opção viável, segura e com excelente previsibilidade de resultado (Anavi *et al.*, 2011; de Freitas Silva *et al.*, 2017)

Os biomateriais utilizados como arcabouços incluem compostos poliméricos, como o ácido polilático, cerâmicas, como β -TCP e hidroxiapatita, pois esses compostos possuem similaridade química e estrutural com a fase inorgânica do osso inativo (Anavi *et al.*, 2011)

O β -fosfato tricálcico (β -TCP), é um material sintético, com alto grau de pureza (90%), pertence à família da apatita, biocompatível, passível de esterilização sem prejuízo à sua composição ou estrutura, com alta solubilidade e rápida reabsorção, favorecendo a neoformação óssea, mas dificultando a manutenção do arcabouço (Gerike *et al.*, 2006; Ebrahimi *et al.*, 2017; de Freitas Silva *et al.*, 2017).

No estudo realizado por Luvizuto *et al.*, em 2011, em defeitos críticos de 5mm de diâmetro, em calvária de ratos, tratados por meio de β -fosfato tricálcico (Cerasorb®), gel de ácido polilático e poliglicólico (Fisiograft®), cimento de fosfato de cálcio (Norian®) isolado ou adicionado de BMP-2 e enxerto autógeno. Os autores observaram nas análises de microtomografia, histomorfometria e de fluorescência que os defeitos preenchidos com β -fosfato tricálcico apresentaram formação óssea superior às dos enxertos autógenos, e que a adição de BPM-2 não resultou em maior formação de tecido ósseo. Contudo, os biomateriais testados não apresentaram diferenças significativas na formação óssea quando comparados aos enxertos autógenos, indicando que, o β -fosfato tricálcico sozinho apresentou propriedades

osteocondutoras e não necessita da suplementação com BPM-2 (Luvizuto *et al.*, 2011).

Em 2017, de Freitas Silva *et al.*, também avaliaram as propriedades osteocondutoras do β -fosfato tricálcico (Cerasorb®) em comparação ao osso orgânico de bovino (Bio-Oss®), osso autógeno e coágulo, em defeitos críticos de 7 mm de diâmetro, em calvária de ratos, nos períodos de 30 e 60 dias, por meio de análises de histomorfometria e imunoistoquímica, e concluíram que o β -fosfato tricálcico é um bom material osteocondutor e com efeitos semelhantes ao do Bio-Oss®, sendo portanto, adequado para a utilização no reparo de defeitos ósseos (Freitas Silva *et al.*).

Neste estudo foi avaliada uma nova biocerâmica, a base de β -fosfato tricálcico, (M3 Health Ind. Com. de Prod. Med. Odont. e Correlatos S.A, Jundiaí, Brasil). Os biomateriais, de origem sintética, apresentam as entre as vantagens: menor tempo de produção, pois não depende das etapas de processamento das quais os biomateriais regenerativos de origem animal necessitam. Por não se tratar de um produto de origem animal, podem ser utilizados em pacientes, independente dos costumes alimentares e/ou religiosos e sem riscos de possíveis transmissões de doenças.

A inserção de novos materiais regenerativos no mercado deve ser precedida por pesquisas bem delineadas e, preferencialmente, em modelo animal, pois além da similaridade fisiológica, permite uma reprodutibilidade de forma padronizada, mantendo uma baixa variação experimental interna, permitindo avaliações completas, a fim de determinar sua previsibilidade, eficácia e segurança (Luvizuto *et al.*, 2011; de Freitas Silva *et al.*, 2017).

O objetivo desse estudo foi avaliar a processo de reparo ósseo, em modelo animal, de uma nova biocerâmica, Plenum® Oss β -TCP, por meio de análise histométrica, microtomografia computadorizada, expressão gênica e imunoistoquímica.

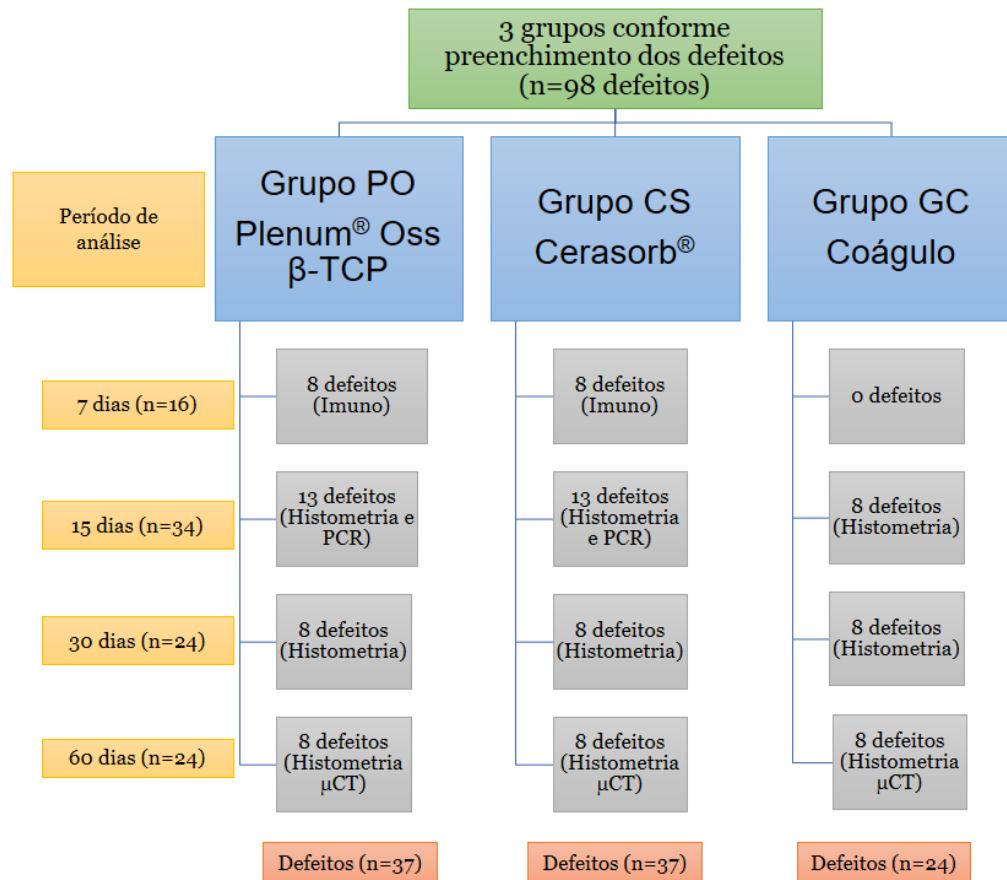
2. Materiais e Métodos

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão em Pesquisa para uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr- UNESP) com número de registro 43/2017. Os experimentos foram realizados dentro dos padrões estabelecidos pela norma ISSO 10993- *“Biological evaluation for medical devices- Part 6: Tests for local effects after implantation”*.

A amostra consistiu de 98 defeitos críticos, confeccionados em calvárias de ratos (*Rattus Norvegicus Holtzman*), adultos, machos, pesando entre 260 e 350 g, com média de 3 meses de vida, fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram mantidos em condições padronizadas, com água e ração *ad libitum* e sob temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos claro/escuro de 12 horas.

Os defeitos ósseos foram realizados nas calvarias dos animais, sendo o Grupo PO, Plenum® Oss β -TCP (M3 Health Ind. Com. de Prod. Med. Odont. e Correlatos S.A, Jundiaí, Brasil), Grupo CS, Cerasorb® (Curassan Ltd., Germany) e grupo GC, Coágulo sanguíneo (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma dos grupos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



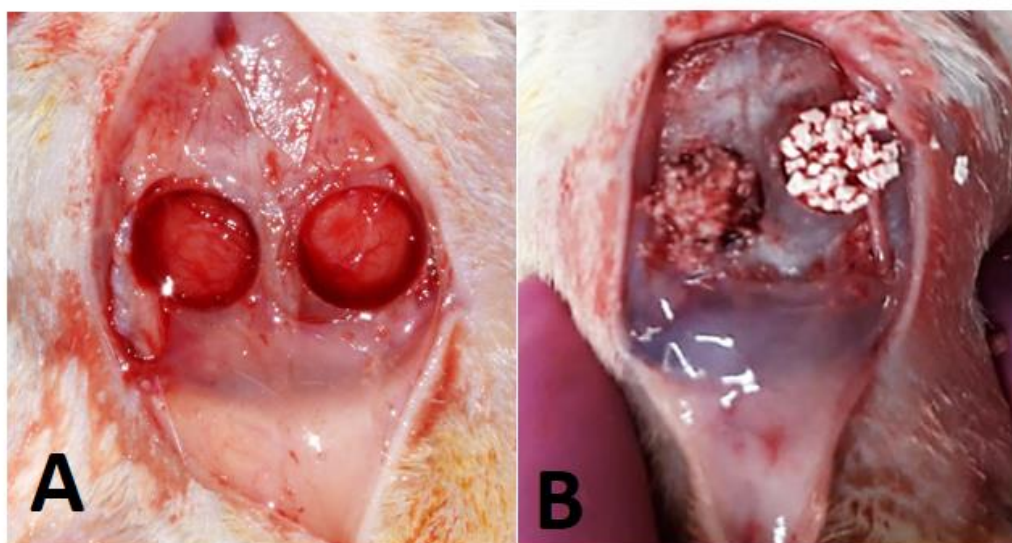
Fonte: Elaboração própria

2.1 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados por meio de administração intramuscular de cloridrato de ketamina, na dose de 25 mg/kg (Syntec - Santana de Parnaíba, SP) e de cloridrato de xilazina, na dosagem de 5 mg/Kg (Syntec - Santana de Parnaíba, SP). Após a anestesia e tricotomia, os animais receberam uma incisão em formato de “V” sobre os ossos parietais, seguido por descolamento. Os defeitos ósseos na calvária dos animais foram confeccionados com o auxílio de uma trefina de 5 mm de diâmetro interno (Ref 103.027, Sistema Neodent, Curitiba, Brasil) sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9%, e consistiu na perfuração em espessura total do osso parietal, mantendo a integridade da dura-máter.

Após o preenchimento dos defeitos, (Figura 2), foram realizadas as suturas com mononylon 5-0 (Ethicon®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil).

Figura 2. (A) Defeitos críticos em calvária, com 5mm de diâmetro interno. (B) Defeito do lado direito, grupo 1, preenchido com Plenum® Oss β -TCP e defeito do lado esquerdo, com Cerasorb®. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

Todos os animais receberam em dose única nos pós-operatório imediato, por via intramuscular Dipirona Sódica D 500 (Zoetis, Campinas, Brasil) e pentabiótico para animais de pequeno porte, 1.200.00UI (Zoetis®, Campinas, Brasil) e evoluíram sem sinais de infecções ou complicações pós-operatórias. A eutanásia dos animais ocorreu por meio de superdosagem de anestésico e foram realizadas nos períodos de 07, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, exceto as amostras para as análises de PCR, que foram adicionadas imediatamente em criotubos e armazenadas em freezer -80°C.

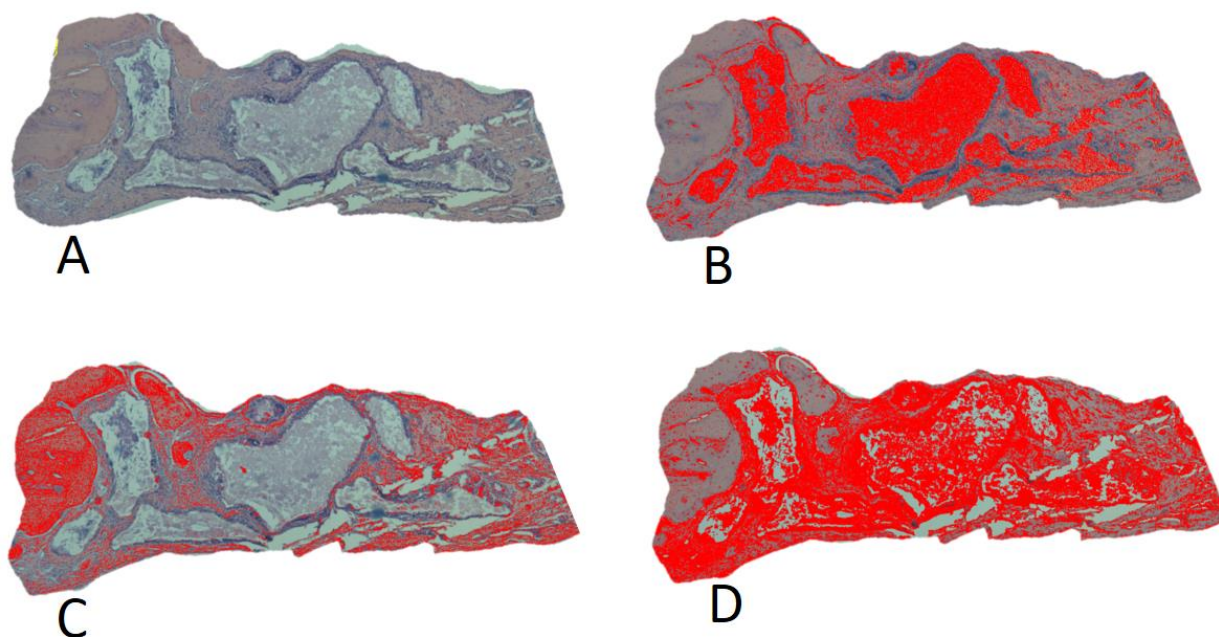
2.2 Análises de Histometria

Após verificada a correta desmineralização das peças, foram obtidos cortes de 6 μ m de espessura de cada peça, divididos em lâminas com 4 cortes cada, corados por hematoxilina-eosina.

A avaliação histométrica das peças foi realizada utilizando-se um microscópio de luz DIASTAR (Leica Reichert & Jung Products®, Germany), com objetivas para aumento de 5 vezes. As imagens representativas foram enviadas para um microcomputador, utilizando-se de uma câmera fotográfica digital (Leica Microsystems® DFC-300-FX – Alemanha), acoplada ao microscópio de luz comum, e

salvas sob a extensão TIF. A determinação dos valores foi realizada empregando-se um software analisador de imagens ImageJ FIJI (Broken Symmetry® Software 1.43.76, USA). Um examinador treinado realizou a análise, tendo os cotos ósseos como referências e delimitando o defeito. A área foi delimitada usando o recurso de “mão livre” no próprio software e as áreas totais da amostra foram estabelecidas como 100%. Em seguida, foram mensuradas a quantidade de tecido ósseo, remanescente de biomaterial e tecido conjuntivo por meio da ferramenta de *threshold* de cores, e os espaços vazios foram subtraídos do cálculo quando presentes (Figura 3). A porcentagem de cada componente foi obtida pela média de duplicatas de cada defeito.

Figura 3. Histometria do Grupo Plenum® Oss β -TCP, período de 60 dias, ilustrando as mensurações por *Threshold* de cores, realizada pelo software ImageJ FIJI®, sendo: A: imagem histológica original, na coloração de HE, sem filtros. B: *Threshold* para remanescente de biomaterial. C: *Threshold* para tecido ósseo. D: *Threshold* para tecido conjuntivo. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

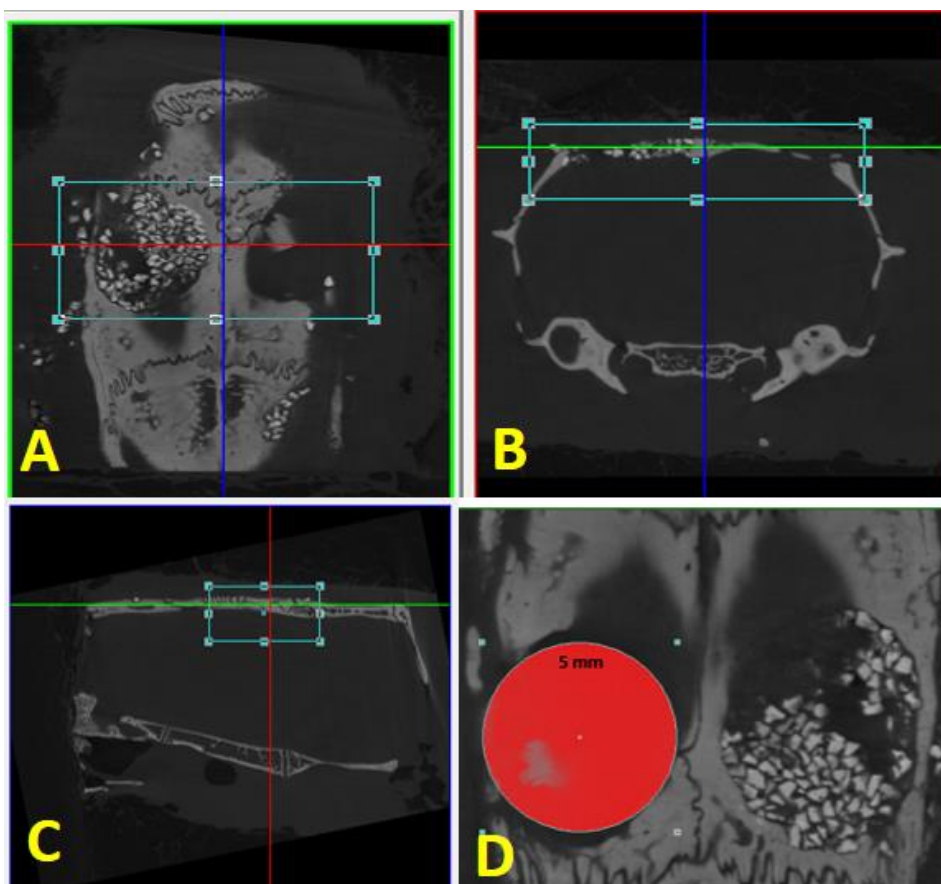
2.3 Microtomografia

Para a aquisição das imagens foram adotadas uma resolução espacial 12 μm ; as imagens foram adquiridas com equipamento modelo Phoenix V |tome| x M Microfocus Scanner (General Electric Company®, Wunstorf, Germany) com ajuste de voltagem de 80 kV. Após as aquisições das imagens, os planos axial, coronal e sagital foram alinhados para identificar visualmente todas as regiões de interesse. Os

volumes de interesse (VOIs) foram adquiridos por meio da reconstrução das imagens bidimensionais (2D) e a reconstrução das imagens volumétricas 3D foram obtidas com a utilização do software SkyScan, DataViewer® v. 1.4.1.

No CTAnalyser® (SkyScan v. 1.11.8.0), uma circunferência de 5.0mm, foi posicionada no centro das áreas dos defeitos e uma espessura de 1.0mm foi considerada para análise. Foi adotado um *threshold* de 105 (máximo) e 75 (mínimo) para a avaliação do tecido ósseo e de 255 (máximo) e 105 (mínimo) para a avaliação dos materiais regenerativos. Os valores dos parâmetros para os materiais regenerativos foram subtraídos dos valores obtidos para o tecido ósseo, para separar os volumes dos materiais regenerativos remanescentes do tecido ósseo neoformado (Figura 4).

Figura 4. A- Reconstrução 3D, Plano axial. B- Plano coronal. C- Plano sagital. D- Delimitação da área de interesse, com mesmo diâmetro do defeito de 5mm. Quirino, L.C, Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

Foram utilizados os seguintes parâmetros para a análise dimensional da microarquitetura do osso trabecular, baseado na nomenclatura padronizada pela

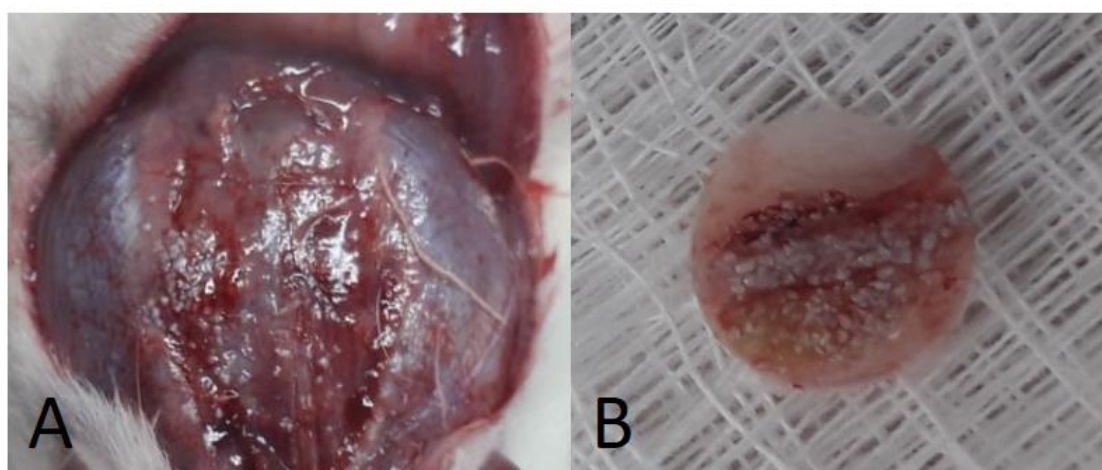
American Society of Bone Mineral Research (2010): Percent bone volume (BV/TV), Trabecular number (Tb.N), Trabecular separation (Tb.Sp), Trabecular thickness (Tb.Th) e: Connectivity density (Com.nDn).

2.4 Análise de Expressão Gênica

No período de 15 dias da enxertia dos materiais regenerativos, foram coletados o tecido ósseo, dos defeitos críticos, de 5 animais acrescentados para essa análise da expressão dos genes RUNX2, IBSP e VEGF nos grupos PO e CS.

Cada fragmento ósseo foi removido com a utilização de uma trefina de 7mm de diâmetro (Harte®, Ribeirão Preto/SP, Brasil), para contemplar com margem de segurança o defeito de 5mm (Figura 5). A remoção foi realizada sob constante irrigação de uma solução resfriada de tampão fosfato-salino (PBS) e posteriormente acondicionados em criotubos de 2,0ml (Corning® EUA), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em Freezer -80°C (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), para que o RNA total seja isolado com o auxílio do reagente Trizol (Life Technologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A extração do RNA foi realizada através do kit Promega (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA).

Figura 5. A). Exposição da região de calvária para visualização da região dos defeitos. B). Fragmento ósseo removido com auxílio de trefina com 7mm, pronto para armazenamento em criotubos com nitrogênio líquido. Quirino, L.C, Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

O RNA foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop®2000 (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) e foi confeccionado o cDNA utilizando 1µg de RNA por meio da reação da transcriptase reversa (M-MLV: transcriptase reversa: High capacity (Waltham, Massachusetts, USA). A sequência dos primers foi amplificada e seus produtos foram submetidos a eletroforese com gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo e visualizados utilizando o software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA).

Por fim, a PCR em tempo real foi conduzida com base no sistema StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando o sistema de corantes fluorescentes para detecção SybrGreen (Primer Design Ltd, Southampton, UK) sob as condições cíclicas: 95° durante 10 minutos para a desnaturação primária, e 35 ciclos de 95° por 15 segundos para abertura das fitas e, finalmente, 60° por 60 segundos para anelamento dos primers e extensão dos fragmentos.

A expressão gênica foi calculada por referência à expressão das proteínas ribossomal mitocondrial e normalizada pela expressão gênica dos fragmentos das paredes do defeito no período de 15 dias.

A expressão gênica dos demais grupos foi avaliada em relação à expressão do grupo controle, que neste estudo, foi a grupo CS, por esse motivo, o grupo CS apresenta um valor próximo a 1.0 (valor médio) e representa quantas vezes a expressão do gene analisado foi maior ou menor em relação à expressão do gene do grupo CS.

2.5 Análise de Imunoistoquímica

As análises de imunoistoquímica foram realizadas por meio da técnica de detecção pela imunoperoxidase. Após a desparafinização dos cortes histológicos, a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio por 30 min. Em seguida, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) e o bloqueio da biotina endógena através de albumina bovina 1% e leite desnatado.

Os anticorpos primários utilizados foram contra as proteínas, osteocalcina (OCN), osteoprotegerina (OPG) e RANKL (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA). O controle negativo foi realizado por meio da omissão de anticorpos primários. Ainda, como controle positivo, foi utilizado a cortical hígida do osso parietal livre de

defeito, para verificação da efetividade dos anticorpos utilizados. O anticorpo secundário usado foi o anticorpo biotinilado anti-rato (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). A Biotina avidina foi utilizada para amplificar o sinal de imunomarcação e o cromógeno utilizado foi o Diaminobenzidina (Dako, Glostrup, Dinamarca). As amostras foram contra-coradas com solução de Hematoxilina Mayer. As imagens foram obtidas usando uma câmera acoplada ao microscópio de luz (Leica Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Alemanha).

A análise descritiva foi realizada por um único examinador treinado, atribuindo escores para verificar a expressão das proteínas na região dos defeitos ósseos, a saber: (0) sem marcação (0% de células/matriz), (1) leve (<25% de células/matriz), (2) moderado (25-50% de células/matriz) e (3) intenso (>50% de células/matriz).

2.6 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram previamente submetidos a teste de normalidade e homogeneidade de variância para seleção dos testes aplicados. Para a comparação dos dados, foi considerado um poder de estudo de 80% e um erro alfa de 5%.

Para as avaliações de histometria, todos os dados passaram no teste de normalidade de Shapiro-Wilk e homocedasticidade de Levene, desta forma, foi utilizado o teste ANOVA two-way com pós teste de Tukey para as comparações entre os grupos e para a variante tempo (15, 30 e 60 dias)

Para as análises de microtomografia computadorizada, os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e homocedasticidade de Levene, com mais de 90% dos dados apresentando distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$), portanto a comparação entre grupos foi realizada com testes paramétricos. A comparação dos parâmetros no *threshold* de tecido ósseo neoformado com teste ANOVA One-way, com pós teste de Tukey. Na avaliação do *threshold* de remanescente de biomaterial, os dados também respeitaram a distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e foram analisados por meio do teste ANOVA one-way, com pós teste de Tukey.

A avaliação da expressão gênica, análise estatística foi realizada comparando os valores médios e de desvio padrão (SD) entre os grupos. Os dados das avaliações para RUNX2, VEGF, IBSP foram submetidos ao pressuposto de normalidade e homogeneidade de variâncias por meio dos Testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe,

respectivamente e apresentaram valores de $p>0,05$ para normalidade e de $p<0,05$ para a homogeneidade.

3 Resultados

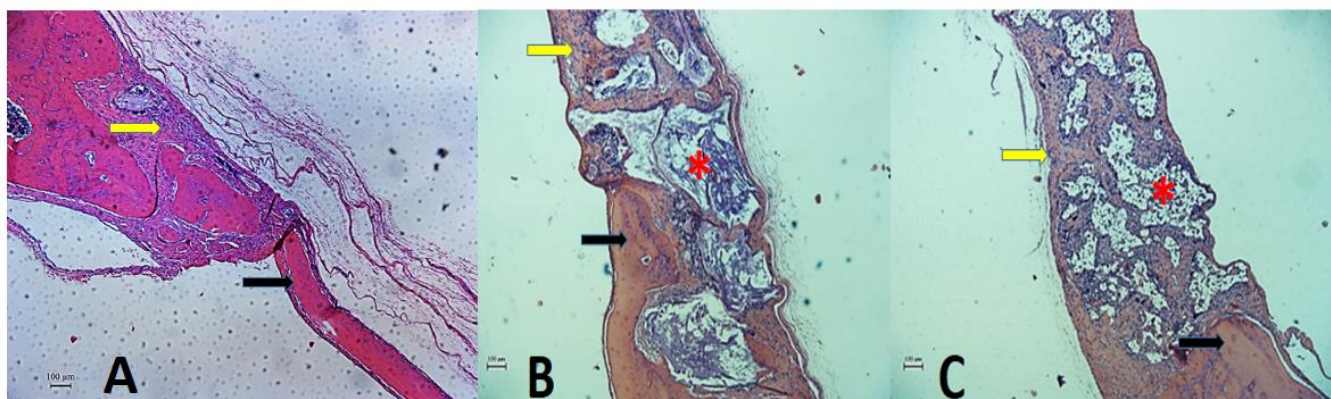
3.1 Análise de Histometria

Foram analisados quantitativamente em porcentagem volumétrica, o tecido ósseo neoformado, tecido conjuntivo e remanescente dos biomateriais regenerativos (tabela 1). O grupo PO, não apresentou diferenças estatisticamente significante para o grupo CS, na neoformação óssea ($p>0,05$), nem na análise do tecido conjuntivo ($p>0,05$) para todos os períodos analisados.

Na comparação com o controle negativo (GC), foi observado que a quantidade de tecido conjuntivo foi semelhante nos períodos de 15 e 30 dias ($p>0,05$), porém, em 60 dias, havia uma maior quantidade de tecido conjuntivo no grupo do PO ($0,56 \pm 0,32$) versus o grupo GC ($0,28 \pm 0,24$), entretanto, não houve diferenças estatísticas com relação ao tecido ósseo neoformado entre estes grupos ($p>0,05$).

Com relação ao remanescente dos biomateriais, o grupo PO apresentou uma maior quantidade de remanescente em todos os períodos avaliados, sendo em 15 dias ($0,68 \pm 0,14$ versus $0,42 \pm 0,13$) e 30 dias ($0,46 \pm 0,19$ versus $0,42 \pm 0,19$) sem diferenças estatísticas, e, aos 60 dias ($0,74 \pm 0,09$ versus $0,39 \pm 0,27$), apresentando diferenças estatísticas em relação ao grupo CS. Figura 6.

Figura 6. Cortes histológicos em microscopia de luz, aumento de 5x, aos 60 dias de cada condição experimental, a saber: asterisco: Biomaterial remanescente, seta preta: Tecido ósseo; seta amarela: tecido conjuntivo. A). Grupo Coágulo sanguíneo; B). Grupo Plenum® Oss β -TCP; C). Grupo Cerasorb®. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

Tabela 1. Análise histométrica dos grupos, nos diferentes períodos avaliados (conjuntivo, osso neoformado e biomaterial remanescente). Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

Tecido Conjuntivo			
	G1 Plenum® Oss β-TCP	G2 Cerasorb®	G3 Coágulo
15 dias	0,51 (0,13)a	0,47 (0,15)a	0,48 (0,29)a
30 dias	0,33 (0,09)a	0,37 (0,15)a	0,26 (0,17)a
60 dias	0,56 (0,32)b	0,45 (0,15)a	0,28 (0,24)a

Tecido Ósseo Neoformado			
	G1 Plenum® Oss β-TCP	G2 Cerasorb®	G3 Coágulo
15 dias	0,58 (0,2)a	0,57 (0,17)a	0,31 (0,28)a
30 dias	0,41 (0,26)a	0,31 (0,15)a	0,29 (0,29)a
60 dias	0,51 (0,37)a	0,43 (0,12)a	0,37 (0,23)a

Biomaterial Remanescente			
	G1 Plenum® Oss β-TCP	G2 Cerasorb®	G3 Coágulo
15 dias	0,68 (0,14)a	0,42 (0,13)a	-
30 dias	0,46 (0,19)a	0,42 (0,19)a	-
60 dias	0,74 (0,09)a	0,39 (0,27)b	-

Fonte: Elaboração própria

3.2 Análise de Micro –CT

Os parâmetros para a análise dimensional da microarquitetura do osso trabecular, foram baseados na nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone Mineral Research de 2010* (Bouxsein et al., 2010).

Na avaliação do *threshold* de tecido ósseo neoformado aos 60 dias, o grupo PO não apresentou diferenças estatísticas significativas para todos os parâmetros analisados ($p > 0,05$), apresentando, portanto, semelhanças entre a proporção de

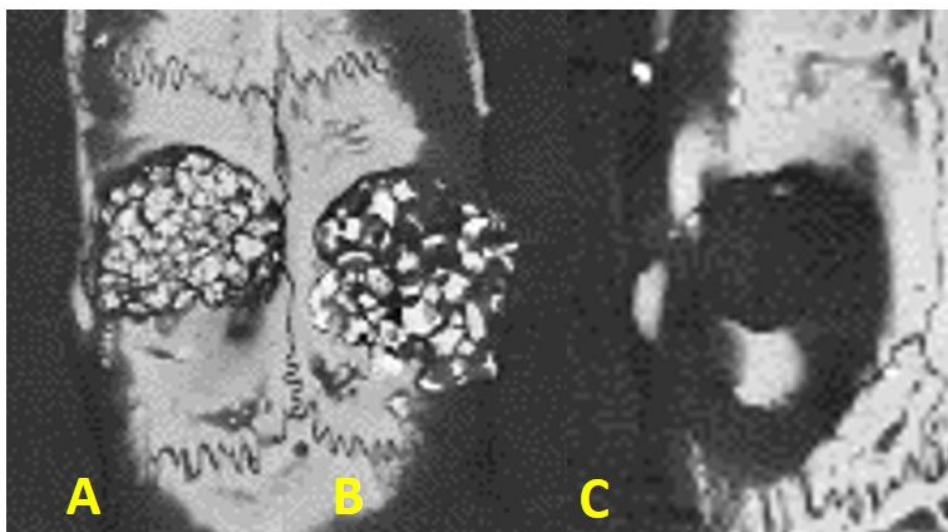
volume ósseo, número, espessura, separação e densidade de conexões entre as trabéculas do grupo CS e do grupo GC. Tabela 2. (Figura 7).

Tabela 2. Parâmetros microtomográficos para o *threshold* de tecido ósseo neoformado nos diferentes grupos de análise. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

Parâmetros osso	G1 Plenum® Oss β-TCP	G2 Cerasorb®	G3 Coágulo
BV/TV	9,84 ± 6,06a	10,86 ± 7,64a	6,61 ± 5,36a
Tb.N	1,22 ± 0,94a	1,46 ± 1,05a	0,66 ± 0,48a
Tb.Th	0,1 ± 0,12a	0,08 ± 0,06a	0,09 ± 0,05a
Tb.Sp	0,6 ± 0,24a	0,56 ± 0,2a	0,8 ± 0,2a
Conn.dn	4,07 ± 4,66a	11,66 ± 9,98a	4,21 ± 3,41a

Fonte: Elaboração própria

Figura 7. Imagem da reconstrução 3D da microtomografia digital computadorizada evidenciando o tecido ósseo permeando o remanescente do biomaterial. A). Grupo Plenum® Oss β-TCP B) Grupo Cerasorb® C) Grupo Coágulo sanguíneo. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

Na análise do threshold para remanescente de biomaterial, também não houve diferenças estatísticas significantes para todos os parâmetros avaliados em relação ao Grupo CS ($p > 0,05$). Tabela 3. (Figura 6).

Parâmetros Biomaterial G1 Plenum® Oss β-TCP G2 Cerasorb®		
BV/TV	11,84 ± 12,85a	9,44 ± 9,59a
Tb.N	0,4 ± 0,4a	0,49 ± 0,47a
Tb.Th	0,2 ± 0,14a	0,12 ± 0,1a
Tb.Sp	0,74 ± 0,26a	0,73 ± 0,25a
Conn.dn	0,77 ± 0,77a	4,7 ± 5,26a

Tabela 3. Parâmetros microtomográficos para o *threshold* de biomaterial remanescente nos diferentes grupos de análise. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

Fonte: Elaboração própria

3.3 Análise de Expressão Gênica

O grupo PO foi avaliado em relação à expressão gênica do grupo controle, que neste estudo, foi o grupo CS, produto já disponível no mercado e com estudos relacionados à sua eficácia e segurança na utilização clínica, por esse motivo, o grupo CS apresenta um valor próximo a 1. O valor médio apresentado pelo grupo PO representa quantas vezes a expressão do gene analisado foi maior ou menor em relação à expressão do gene do grupo controle.

3.3 1. RUNX2

O grupo PO (4.06 ± 1.15) apresentou diferença estatísticas quando comparado ao grupo CS (2.03 ± 0.91), indicando uma maior expressão para RUNX2. Tabela 4.

Tabela 4 - Análise da expressão gênica de RUNX2 para a análises dos biomateriais regenerativos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

RUNX2	
G1 Plenum® Oss β-TCP	G2 Cerasorb®
4,06±1.15a	2,03±0.91b

Teste de t Student, não pareado. Fonte: Elaboração própria.

3.3 2. IBSP

O grupo PO (15.18 ± 1.58) apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo CS (3.87 ± 2.43), indicando uma maior expressão para IBSP. Tabela 5.

Tabela 5 - Análise da expressão gênica de IBSP para a análises dos biomateriais regenerativos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

IBSP	
G1 Plenum® Oss β -TCP	G2 Cerasorb®
15,18 $\pm$ 1.58a	3,87 $\pm$ 2.43b

Teste de t Student não pareado. Fonte: Elaboração própria.

3.3 3. VEGF

Não foi observado diferença estatisticamente significante entre o grupo PO e CS para a expressão de VEGF ($p>0,05$) Tabela 6.

Tabela 6 - Análise da expressão gênica de VEGF para a análises dos biomateriais regenerativos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

VEGF	
G1 Plenum® Oss β -TCP	G2 Cerasorb®
8,54 $\pm$ 2.93a	4,473 $\pm$ 2.68a

Teste de t Student, não pareado. Fonte: Elaboração própria.

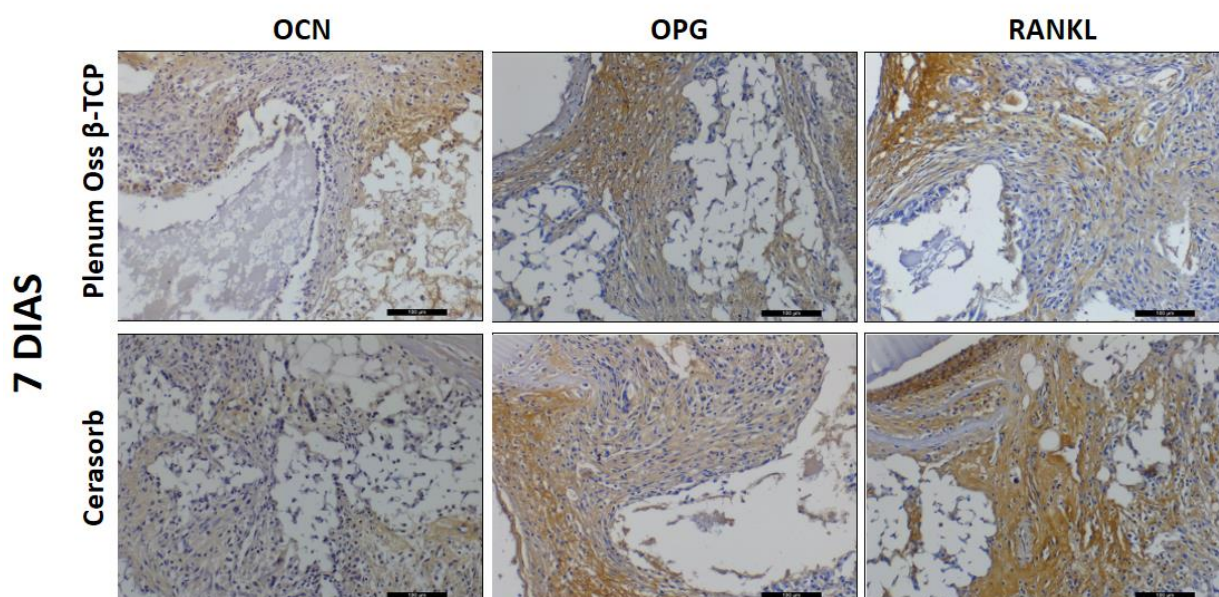
3.4 Análise de Imunoistoquímica

Foram realizadas reações imunoistoquímicas aos 7 dias, no início da atividade de reparo junto aos biomateriais, para detectar a presença dos marcadores osteocalcina (OCN), osteoprotegerina (OPG) e RANKL, com imunomarcações positivas para todas as proteínas avaliadas (Figura 8).

No grupo PO foi observado uma moderada marcação de osteocalcina (2), presente em células osteoblástica assim como na matriz extracelular e imunomarcação moderada na presença de osteoprotegerina (2) e RANKL (2).

No grupo CS, foi verificada uma leve presença de osteocalcina (1) na matriz extracelular não mineralizada, envolvendo o biomaterial. Foi observada uma moderada marcação para osteoprotegerina (2) e intensa marcação para RANKL (3). Tabela 7.

Figura 8. Painel da imunohistoquímica evidenciando as marcações das proteínas OCN, OPG e RANKL para todos os grupos no período de 7 dias. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

Tabela 7. Score de acordo com as imunomarcações. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

Proteína	Plenum® Oss β-TCP	Cerasorb®
OCN	2	1
OPG	2	2
RANKL	2	3

Fonte: Elaboração própria

4. Discussão

O objetivo desse estudo foi avaliar o processo de reparo ósseo de uma biocerâmica bifásica (Plenum® Oss β -TCP) sintética, considerando a neoformação óssea, a proliferação de tecido conjuntivo e a presença de remanescentes de biomaterial, em preenchimento de defeitos críticos em calvárias de ratos, em comparação a outra biocerâmica comercial (Cerasorb®) e ao coágulo sanguíneo como controle negativo.

Neste estudo, o material teste, Plenum® Oss β -TCP, apresentou-se como uma opção viável e com resultados satisfatórios para o processo de reparo do tecido ósseo, com resultados semelhantes ao biomaterial controle, Cerasorb®, tanto em quantidade de tecido ósseo preenchendo o sítio reparacional, quanto qualitativamente. No período de 07 dias, foi observada uma maior imunomarcagem de proteínas relacionadas com a formação e mineralização óssea no grupo PO, mantida também no período de 15 dias, com um aumento na expressão gênica de marcadores da atividade osteoblástica e osteocondução no grupo PO em comparação ao grupo CS, porém, a quantificação do tecido ósseo, aos 60 dias mostrou que praticamente não houve diferença entre os grupos avaliados, sugerindo que o processo de reparo iniciado pelo grupo PO é mais intenso no período inicial.

A utilização de substitutos ósseos é um recurso utilizado pela medicina e odontologia, atuando como arcabouço e reservatório mineral, auxiliando a neoformação óssea e no reestabelecimento da área lesada, viabilizando uma posterior reabilitações com implantes orais osseointegrados (Souza *et al.*, 2020).

Dentre os grupos de materiais regenerativos, o que mais se assemelha com a composição óssea, é o das biocerâmicas à base de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita, e o β fosfato tricálcico. O conteúdo iônico das biocerâmicas não interfere na fisiologia corporal, e proporciona elevada biocompatibilidade, além do potencial osteocondutor, favorecendo a formação de uma matriz osteóide diretamente sobre a superfície dos fosfatos de cálcio (Ge *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2020).

Quando comparado o tecido mineralizado formado pelos grupos PO e CS, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois materiais regeneradores, tanto na análise de histometria quanto na microtomografia computadorizada, com número, espessura, separação das trabéculas, além da

densidade de conectividade dessas trabéculas, indicando que o PO apresentou a formação de um tecido mineralizado semelhante ao controle positivo comercial CS.

No estudo realizado por de Freitas Silva *et al.*, em 2017, em defeitos críticos com 7.0 mm de diâmetro em calvárias de ratos, foi observado que o defeito preenchido com β -TCP, aos 30 dias, já apresentava tecido ósseo neoformado ao redor do remanescente de biomaterial e posteriormente um aumento da neoformação óssea em 60 dias, mas sem diferenças estatísticas em relação ao grupo BioOss®, porém, vale ressaltar que todos defeitos foram recobertos por uma membrana absorvível de origem bovina, indicando que o β -TCP poderia apresentar-se como um bom osteocondutor, biocompatível e com resultados semelhantes ao do osso bovino inorgânico. Em nosso trabalho, quando comparados biomateriais com a mesma origem sintética, a neoformação óssea foi semelhante entre os grupos para todos os períodos analisados, provavelmente, a adição de uma membrana recobrindo o defeito, poderia aumentar quantitativamente a neoformação óssea, no decorrer período estudado.

No estudo feito por Luvizuto *et al.*, em 2011, utilizando Cerasorb®, gel de ácido polilático e poliglicólico e cimento de fosfato de cálcio no preenchimento de defeitos críticos em calvária de ratos, observou pela análise de microtomografia que houve o fechamento completo dos defeitos apenas no grupo Cerasorb®, com interligação total por um conglomerado de biomaterial e tecido ósseo neoformado, com remanescente de β -TCP visíveis e em íntimo contato com o tecido ósseo, e com resultados semelhantes na associação de β -TCP + BMP2, fato não observado pelos outros materiais regenerativos avaliados no estudo. Os resultados indicaram que o Cerasorb® sem BMP2, leva à mineralização completa de defeitos críticos em calvárias de ratos, com melhor desempenho que todos os outros materiais regenerativos testados, não sendo necessário ou útil suplementar com BMP2 nas condições propostas pelo estudo. Em comparação ao nosso estudo, não foi observado a completa mineralização em nenhum dos defeitos críticos relacionados ao uso dos β -TCP, tendo PO e o CS, a formação de tecido mineralizado e de remanescentes desses materiais regenerativos, semelhantes entre si, ambos eficientes para reparo de defeitos críticos em calvária de ratos (Freitas Silva *et al.*, 2011).

Quando a comparação foi realizada com o grupo coágulo, os resultados foram semelhantes entre os grupos, incluindo a comparação com GC, tanto pela análise de histometria quanto de microtomografia computadorizada. No estudo realizado por

Souza *et al.*, em 2020, também foi observada uma maior formação óssea no grupo coágulo em comparação aos defeitos preenchido com biomateriais, em defeitos de 8mm em calvária de ratos. Os autores relacionaram estes resultados com a quantidade limitada de células osteoblásticas na calvária dos ratos, exigindo o recrutamento de células mesenquimais do tecido perivascular para a regeneração óssea completa. Sendo assim, para que o novo osso seja formado, os materiais regenerativos devem ser primeiramente absorvidos, o que exige um maior tempo para o reparo ósseo em comparação com as áreas tratadas com coágulo.

Para a análise dos remanescentes dos biomateriais, considerando os mesmos parâmetros microtomográficos, o grupo PO apresentou resultados semelhantes ao grupo do CS, embora, pela análise de histometria, o grupo PO apresentou um maior volume que o grupo CS, resultado provavelmente relacionado com a diferença entre a porosidade dos biomateriais, sendo de 50% para o PO e de 65% para o CS, portanto, como o PO apresenta uma maior área de superfície para reabsorção que CS, consequentemente, necessita de maior tempo para ser reabsorvido. Vale observar que não foi possível realizar uma comparação da quantidade de biomaterial remanescente intra-grupos e inter-grupos ao longo dos períodos, devido a avaliação ser realizada em animais diferentes em cada período avaliado.

O objetivo das análises de PCR, foi avaliar a expressão dos genes relacionados com a diferenciação dos osteoblastos (RUNX2), da mineralização da matriz óssea (IBSP) e da proliferação de células endoteliais, responsáveis pela angiogênese (VEGF). Os estudos relacionados com a atividade celular, evidenciam o período de 15 dias como o período de maior atividade celular no sítio reparacional, correspondendo com uma taxa de maior atividade celular, sendo este processo quase totalmente finalizado no período de 28 dias, justificando, portanto, a análise apenas no período de 15 dias nesse presente estudo (Okamoto & de Russo, 1973; Macedo *et al.*, 2018).

A reabsorção de β -TCP gera micro lacunas osteocondutoras, com alta concentração de íons cálcio e fosfato, auxiliando no processo de formação e mineralização óssea, evidenciado pela expressão gênica de RUNX2, sendo relacionada com a diferenciação celular, indicando a atividade do fator de transcrição, diferenciando pré-osteoblastos em osteoblastos e pela expressão de IBSP, relacionada com a maior mineralização da matriz óssea, observada pela maior

expressão no grupo PO em relação ao CS, indicando uma neoformação óssea mais madura no grupo PO.

O desenvolvimento de uma microvasculatura e microcirculação são críticas para a homeostase e regeneração do osso novo, sem ela, ocorre a degeneração e morte óssea, funções observadas pela expressão de VEGF, que foi semelhante entre os grupos PO e CS, resultados também observados por Chen et al. Em 2014, quando comparou diferentes proporções de β -TCP em biocerâmicas bifásicas em ratos, e observou que a maior proporção de β -TCP foi mais favorável à angiogênese, mas também sem diferenças estatísticas (Chen et al., 2014)

Outros fatores relacionados com a homeostase óssea, como o processo dinâmico de *turnover* ósseo, no qual a formação e a reabsorção óssea preservam a massa óssea e os níveis de cálcio e fosfato no organismo, a proporção OPG / RANKL, fornece uma tendência à resposta do tecido a formação ou à reabsorção óssea. Diante disso, no presente estudo, observamos uma maior imunomarcacão favorável para a formação óssea no grupo PO, apresentando um equilíbrio entre a proporção entre OPG/RANKL e imunomarcacão moderada para OCN, relacionada com a fase final da mineralização da matriz óssea, resultados correlacionados com a expressão gênica, evidenciando uma maior expressão de RUNX2 e IBSP, também relacionados com uma maior atividade osteoblástica no grupo PO em relação ao CS, portanto, indicando condições celulares mais favoráveis para as etapas reparacionais subsequentes no grupo PO. Hassumi et al. em 2018, também observou em seu estudo avaliando o processo de reparo ósseo em ratos, pela imunomarcacão, uma alta atividade de proteínas envolvidas na síntese da matriz mineralizada, como para OPG.

A formação óssea em defeitos de calvária de tamanho crítico é fortemente dependente das propriedades osteocondutoras dos enxertos, e os biomateriais regenerativos podem fornecer uma matriz osteocondutoras, que orientam a formação do novo osso para o defeito. O desafio da engenharia tecidual é produzir um material regenerativo com propriedades osteocondutoras favoráveis, semelhantes ou até superiores ao enxerto autógeno (Luvizuto et al., 2011; Wei et al., 2020).

As diferenças observadas nos resultados desse estudo provavelmente estejam relacionadas com as características peculiares de cada biomaterial, como diferenças entre a porosidade das partículas, levando a taxas de reabsorções diferentes, porém, as similaridades entre o tecido neoformado e o remanescente de material regenerativo, além de condições celulares favoráveis no grupo PO, permitem afirmar que a sua utilização é segura, e promoverá o processo de reparo ósseo em defeitos críticos.

5 Conclusão

Em defeitos críticos na calvária de ratos, o Plenum® Oss β -TCP, dentro dos parâmetros avaliados, apresentou resultados semelhantes na comparação com o biomaterial padrão e apresentando condições celulares iniciais mais favoráveis que o controle positivo.

Agradecimentos

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

Os autores agradecem à empresa M3 Health® pela doação dos biomateriais e suporte no presente trabalho.

Nota*: O presente trabalho se baseou na tese de doutorado da aluna Lilian Caldas Quirino, do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia - Campus de Araraquara.

6 Referências

1. Anavi Y, Avishai G, Calderon S, Allon DM. Bone remodeling in onlay beta-tricalcium phosphate and coral grafts to rat calvaria: microcomputerized tomography analysis. *J Oral Implantol*. 2011 Aug;37(4):379-86. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-09-00128.1. Epub 2010 Jun 16. PMID: 20553149.
2. Beger B, Blatt S, Pabst AM, Hansen T, Goetz H, Al-Nawas B, Ziebart T. Biofunctionalization of synthetic bone substitutes with angiogenic stem cells: Influence on regeneration of critical-size bone defects in an in vivo murine model. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018 Sep;46(9):1601-1608. doi: 10.1016/j.jcms.2018.06.002. Epub 2018 Jun 8. PMID: 30196861.
3. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141. PMID: 20533309.
4. Chen Y, Wang J, Zhu XD, Tang ZR, Yang X, Tan YF, Fan YJ, Zhang XD. Enhanced effect of β -tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: in vitro and in vivo evidence. *Acta Biomater*. 2015 Jan; 11: 435-48. doi: 10.1016/j.actbio.2014.09.028. Epub 2014 Sep 22. PMID: 25246313.
5. de Freitas Silva L, de Carvalho Reis ENR, Barbara TA, Bonardi JP, Garcia IR Junior, de Carvalho PSP, Ponzoni D. Assessment of bone repair in critical-size defect in the calvarium of rats after the implantation of tricalcium phosphate beta (β -TCP). *Acta Histochem*. 2017 Jul;119(6):624-631. doi: 10.1016/j.acthis.2017.07.003. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28732677.
6. Ebrahimi M, Botelho MG, Dorozhkin S V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Mater Sci Eng C*. 2017; 71: 1293–312
7. Ge R, Xun C, Yang J, Jia W, Li Y. In vivo therapeutic effect of wollastonite and hydroxyapatite on bone defect. *Biomed Mater*. 2019 Oct 8;14(6):065013. doi: 10.1088/1748-605X/ab4238. PMID: 31491772
8. Gerike W, Bienengräber V, Henkel KO, Bayerlein T, Proff P, Gedrange T, et al. The manufacture of synthetic non-sintered and degradable bone grafting substitutes. *Folia Morphol (Warsz)*. 2006;65(1):54–5
9. Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jan 1;68(1):187-200. doi: 10.1002/jbm.a.10050. PMID: 14661264. Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jan 1;68(1):187-200. doi: 10.1002/jbm.a.10050. PMID: 14661264.
10. Hassumi JS, Mulinari-Santos G, Fabris ALDS, Jacob RGM, Gonçalves A, Rossi AC, Freire AR, Faverani LP, Okamoto R. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *J Appl Oral Sci*. 2018 Jun

- 18; 26: e20170326. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0326. PMID: 29898174; PMCID: PMC6010327.
11. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85(3):777-786
 12. Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials*. 2011 May;32(15):3855-61. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.076. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21376389.
 13. Luvizuto ER, de Oliveira JCS, Gomes-Ferreira PHS, Pereira CCS, Faverani LP, Antoniali C, Okamoto R. Immunohistochemical response in rats of beta-tricalcium phosphate (TCP) with or without BMP-2 in the production of collagen matrix critical defects. *Acta Histochem*. 2017 Apr;119(3):302-308. doi: 10.1016/j.acthis.2017.02.006. Epub 2017 Mar 3. PMID: 28262327.
 14. Macedo RM, Lacerda SA, Okamoto R, Shahdad S, Brentegani LG. Vital Bone Formation After Grafting of Autogenous Bone and Biphasic Calcium Phosphate Bioceramic in Extraction Sockets of Rats: Histological, Histometric, and Immunohistochemical Evaluation. *Implant Dent*. 2018 Dec;27(6):615-622. doi: 10.1097/ID.0000000000000815. PMID: 30188365
 15. Okamoto T, de Russo MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Aracatuba*. 1973;2(2):153-69. PMID: 4523734.
 16. Souza EQM, Costa Klaus AE, Espósito Santos BF, Carvalho da Costa M, Ervolino E, Coelho de Lima D, Fernandes LA. Evaluations of hydroxyapatite and bioactive glass in the repair of critical size bone defects in rat calvaria. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2020 Oct-Dec;10(4):422-429. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.07.014. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32775186; PMCID: PMC7403772.
 17. Wei S, Ma JX, Xu L, Gu XS, Ma XL. Biodegradable materials for bone defect repair. *Mil Med Res*. 2020 Nov 10;7(1):54. doi: 10.1186/s40779-020-00280-6. PMID: 33172503; PMCID: PMC7653714

3.3 Publicação 3

AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA POR MEIO DE MEMBRANA A BASE POLIDIOXANONA. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA, EXPRESSÃO GÊNICA, HISTOMÉTRICA E MICROTOMOGRÁFICA.

Lilian Caldas QUIRINO^a, Pedro Henrique de Azambuja CARVALHO^a, Cássio Amaro COMACHIO^a, Renato Torres AUGUSTO-NETO^a, Marisa Aparecida Cabrini GABRIELLI^a, Roberta OKAMOTO^b, Valfrido Antonio PEREIRA-FILHO^a

^a Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara, Araraquara, Brasil.

^b Departamento de Ciências Básicas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Araçatuba, Brasil.

Palavras-chave: Substitutos Ósseos. Polidioxanona. Experimento animal

Fonte de financiamento: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) –Código de Financiamento 001.

Endereço completo do autor para correspondências:

Lilian Caldas Quirino

Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, Brasil.

Rua Humaitá, 1680

CEP 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brasil

E-mail: lc.quirino@unesp.br

-
- Artigo formatado de acordo com as normas para publicação no periódico *Polymers* – Qualis CAPES A2 – Fator de impacto 4.329 (2020). Rank - SJR Autenticação: Índice H (Scopus) 2018: 53. Journal Rank: *JCR* - Q1 (*Polymer Science*) / *CiteScore* - Q1 (*Polymers and Plastics*). ISSN 2073-4360.

Resumo

Introdução: A regeneração óssea guiada (ROG) é uma abordagem que induz a osteopromoção por meio do uso de membranas. Estas barreiras apresentam um comportamento bioativo, indo além da função mecânica. A polidioxanona é uma opção sintética, já amplamente utilizada na medicina e odontologia, com bons resultados.

Objetivo: Avaliar o reparo ósseo, em defeitos críticos, em calvária de ratos, por meio de uma membrana de polidioxanona (Plenum® Guide). **Materiais e métodos:** Foram realizados 111 defeitos críticos na calvária de ratos, divididos em 3 grupos: Grupo PO (Plenum® Osshp); Grupo PG (Plenum® Guide + Plenum® Osshp) e Grupo BG (Geistlich Bio-Gide® + Plenum® Osshp). A eutanásia foi realizada nos períodos de 07, 15, 30 e 60 dias após as cirurgias. As amostras foram submetidas às análises de imunoistoquímica (RUNX2 e OPN), expressão gênica (RUNX2, IBSP e VEGF), histometria e microtomografia (Micro CT). **Resultados:** Na comparação entre os grupos PG e BG, pelas análises de histometria e de microtomografia, não evidenciaram diferenças entre a formação de tecido conjuntivo, tecido ósseo neoformado e remanescentes de biomateriais entre os grupos. Nas análises de biologia molecular, observamos imunomarcações leve para RUNX2 e OPN para os grupos BG e moderada no grupo PG para ambas proteínas, e uma maior expressão gênica para VEGF no grupo PG, porém, com menor expressão para RUNX2 e IBSP em relação ao grupo BG. Quando comparados os grupos PO e PG, observamos pela análise de histometria uma maior quantidade de tecido conjuntivo e de remanescentes de biomaterial nos períodos de 15 e 30 dias no grupo PG, porém, sem diferenças ao 60 dias e a neoformação óssea foi semelhante entre os grupos nos períodos de 30 e 60 dias. A análise de microtomografia também não mostrou diferenças entre os grupos, exceto por uma maior densidade de conectividade e número de trabéculas do tecido ósseo neoformado e um maior volume e densidade de conectividade dos remanescentes do biomaterial no grupo PG. Na análise de imunoistoquímica, observamos imunomarcações leve para RUNX2 e OPN no grupo PO e moderado no grupo PG para ambas proteínas. Nas análises de PCR, observamos uma maior expressão para VEGF e IBSP no grupo PG, mas sem diferenças para RUNX2 entre os grupos PO e PG. **Conclusão:** A partir da metodologia deste estudo, podemos concluir que a membrana Plenum® Guide, pode ser uma opção de membrana sintética e absorvível, a ser utilizada na regeneração óssea guiada.

Palavras Chave: Polidioxanona. Regeneração óssea guiada. Modelos animais.

1 Introdução

A regeneração óssea guiada (ROG) é uma abordagem que promove a osteopromoção por meio do uso de membranas, absorvíveis e não absorvíveis, como barreiras mecânicas. As membranas têm como função evitar a migração de células epiteliais para o interior do defeito ósseo, promovendo a manutenção do espaço. Novos estudos sugerem um novo papel na utilização de membranas, com evidências celulares e moleculares, conferindo à membrana um comportamento bioativo, e não apenas de barreira passiva, contribuindo com maior eficácia para favorecer a neoformação óssea. (Chiapasco *et al.*, 2009; Turri *et al.*, 2016; Elgali *et al.*, 2017).

As membranas absorvíveis, usualmente fabricadas com colágeno, apresentam como vantagem a permeabilidade e nutrição do tecido adjacente, entretanto, apresentam, em alguns casos, a desvantagem de serem rapidamente absorvidas. Por outro lado, as membranas de polímeros sintéticos, mantem o espaço ou material de preenchimento no local desejado por um período mais prolongado, com previsibilidade clínica desejável até sua remoção ou absorção. (Ignatius *et al.*, 2001; Chiapasco *et al.*, 2006; Chiapasco *et al.*, 2009).

Dentre os polímeros sintéticos, o polidioxanona (PDO) têm surgido como uma excelente alternativa para produção de materiais para engenharia tecidual, pela sua excelente resposta celular em relação à proliferação, diferenciação, biocompatibilidade, baixa resposta inflamatória, além de possuir elevada força mecânica (Li *et al.*, 2005; Hakimi *et al.*, 2012; Saska *et al.*, 2021).

A polidioxanona é um polímero incolor, sintetizado pelo monômero precursor *p*-dioxanona, que possui um oxigênio do grupo éter na estrutura de cadeia polimérica, conferindo flexibilidade ao material e são degradados por hidrólise. Os subprodutos finais são excretados principalmente na urina ou exalado como CO₂. A PDO tem sido amplamente utilizado e possui aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA), com uma completa degradação variando de 5 a 12 meses, dependendo do método e condições do processo de manufatura (Sabino *et al.*, 2000; Goonoo *et al.*, 2015).

Além do uso em fios de suturas, a polidioxanona é amplamente utilizada em membranas/folhas para reconstrução do assoalho orbital. Beck-Broichsitter *et al.*, em 2015, realizaram um estudo retrospectivo em 101 pacientes, acompanhados ao longo de 12 anos, com o objetivo de avaliar as fraturas do soalho da órbita reconstruídas com folhas de polidioxanona, e constataram que o tratamento foi bem-sucedido em

defeitos com tamanho igual ou menor a 200mm², e que complicações como diplopia, hiperestesia e alterações de motilidade ocular não puderam ser atribuídas exclusivamente ao uso da polidioxanona (Beck-Broichsitter *et al.*, 2015).

Saska *et al.*, em 2021, em um estudo comparando a membrana Plenum® Guide (PG) com a BioGide® (BG), verificaram que a PG apresentou uma melhor migração das células tronco que a do grupo BG, demonstrando que as membranas a base de Polidioxanona facilitam o crescimento celular interno e a diferenciação *in vitro*. Observaram vários pontos de calcificações, indicando o seu potencial de aplicação como arcabouço, além de ser seis vezes mais resistente no teste de alongamento/ruptura e quatro vezes menos tóxica que a BG (Saska *et al.*, 2021).

Esta membrana sintética e absorvível, a base de polidioxanona, (Plenum® Guide - M3 Health Ind. Com. de Prod. Med. Odont. e Correlatos S.A, Jundiaí, Brasil), apresenta, segundo os fabricantes, cristalinidade de 55% e é formada por filamentos com diâmetros variando entre 500 nanômetros a 2 micrômetros.

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar por meio de análises imunoistoquímica, expressão gênica, histométrica e microtomografia computadorizada, o processo de regeneração óssea guiada com o uso de membrana de polidioxanona (Plenum® Guide), no tratamento de defeitos críticos em calvária de ratos.

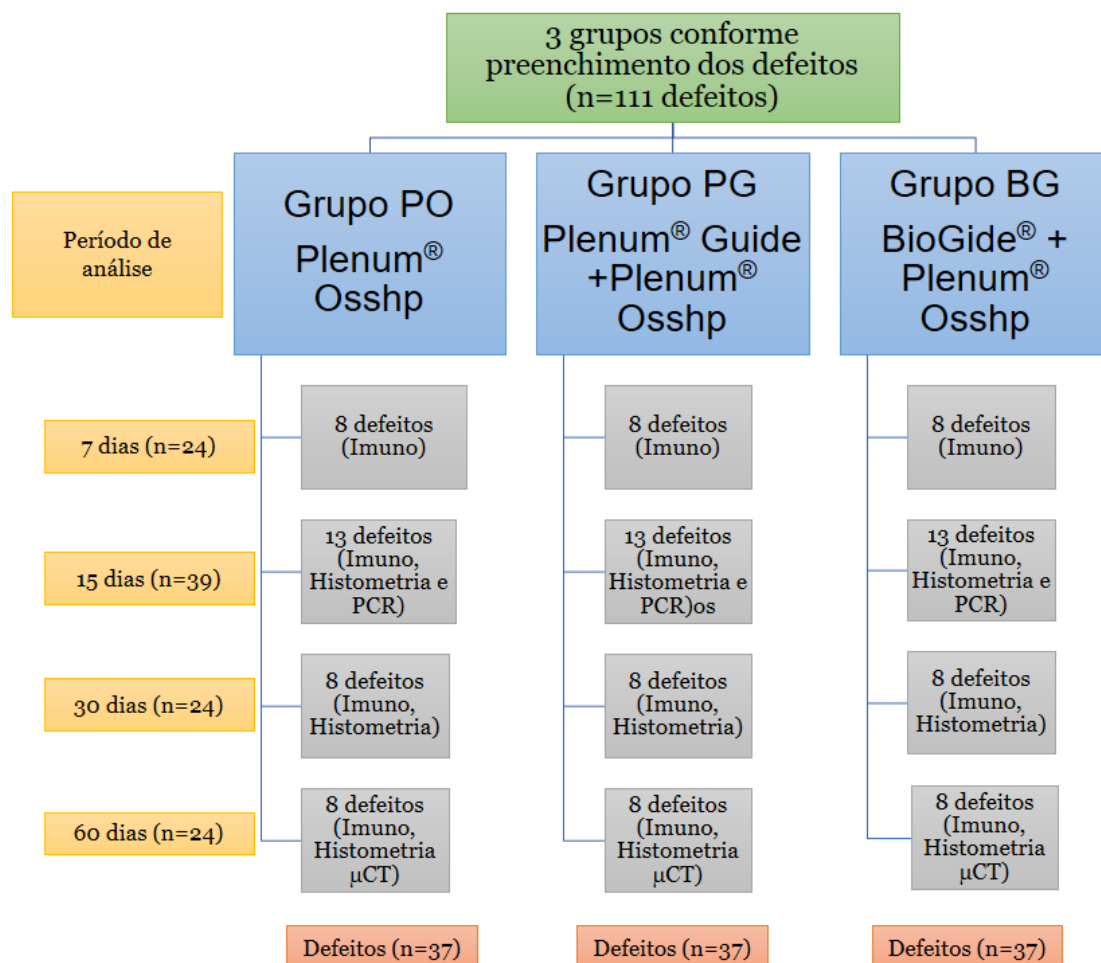
2. Materiais e métodos

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, com número de registro 43/2017. Os experimentos foram realizados dentro dos padrões estabelecidos pela norma ISO 10993- “*Biological evaluation for medical devices- Part 6: Tests for local effects after implantation*”.

A amostra consistiu de 111 defeitos críticos, confeccionados em calvárias de ratos (*Rattus Norvegicus Holtzman*), adultos, machos, pesando entre 260 e 350 g, com média de 3 meses de vida, fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram mantidos em condições padronizadas, com água e ração *ad libitum* e sob temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos claro/escuro de 12 horas.

Os defeitos ósseos foram realizados nas calvárias dos animais, sendo: Grupo PO Plenum Osshp (M3Health® Ind. Com. de Prod. Med. Odont. e Correlatos S.A, Jundiaí, Brasil), Grupo PG Plenum® Guide + Plenum Osshp (M3Health® Ind. Com. de Prod. Med. Odont. e Correlatos S.A, Jundiaí, Brasil) e Grupo BG Geistlich Bio-Gide® (GEISTLICH Pharma AG, Suíça) + Plenum Osshp (M3Health®, Jundiaí, São Paulo, Brasil), como esquematizado no fluxograma da Figura 2.

Figura 2. Fluxograma dos grupos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

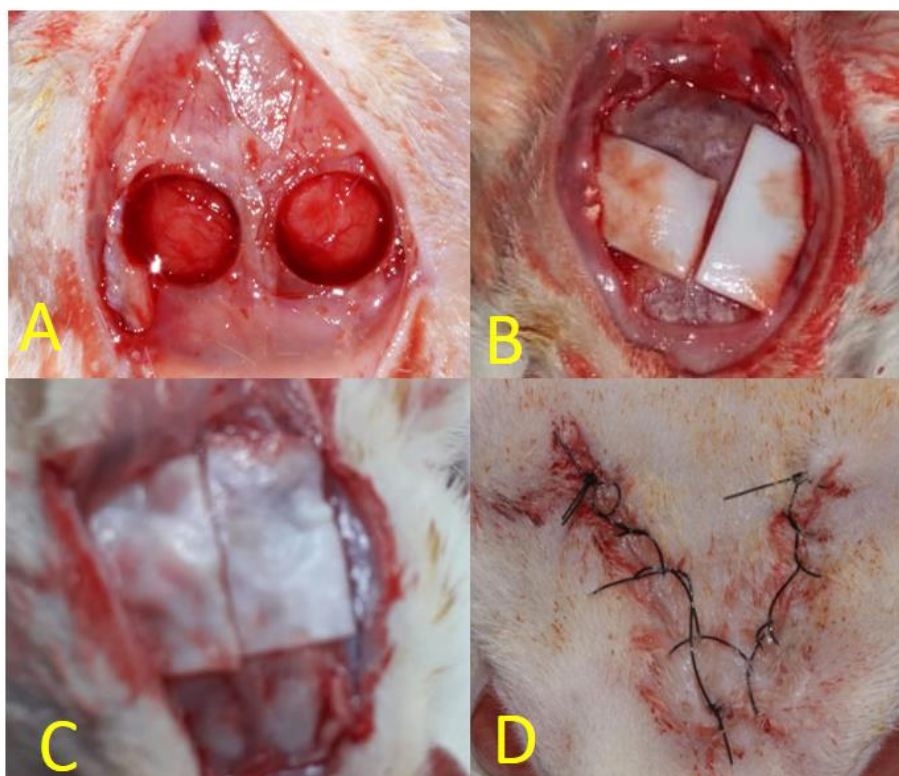
2.1 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados por meio de administração intramuscular de cloridrato de ketamina, na dose de 25 mg/kg (Syntec - Santana de Parnaíba, SP) e de cloridrato de xilazina, na dosagem de 5 mg/Kg (Syntec - Santana de Parnaíba, SP). Após a anestesia e tricotomia, os animais receberam uma incisão em formato de “V” sobre os ossos parietais, seguido por descolamento. Os defeitos ósseos na calvária dos animais foram confeccionados com o auxílio de uma trefina de 5 mm de diâmetro interno (Ref 103.027, Sistema Neodent, Curitiba, Brasil) sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9%, e consistiu na perfuração em espessura total do osso parietal, mantendo a integridade da dura-máter.

Todos os defeitos ósseos foram preenchidos com Plenum® Osshp, sendo adicionado aos grupos PG e BG as membranas recobrindo os defeitos; logo após,

foram realizadas as suturas com mononylon 5-0 (Ethicon®, Johnson & Johnson).
Figura 3.

Figura 3. (A) Criação de defeitos críticos em calvária de ratos, com auxílio de uma trefina com 5mm de diâmetro interno. (B), Grupo PG. (C) Grupo BG. (D) Aspecto final da sutura. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

Todos os animais receberam em dose única nos pós-operatório imediato, por via intramuscular Dipirona Sódica D 500 (Zoetis, Campinas, Brasil) e pentabiótico para animais de pequeno porte, 1.200.00UI (Zoetis®, Campinas, Brasil) e evoluíram sem sinais de infecções ou complicações pós-operatórias. A eutanásia dos animais ocorreu por meio de superdosagem de anestésico e foram realizadas nos períodos de 07, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, exceto as amostras para as análises de PCR, que foram adicionadas imediatamente em criotubos e armazenadas em freezer -80°C.

2.2 Análise de Imunoistoquímica

Foram realizadas reações imunoistoquímicas aos 7 dias, no início da atividade de reparo junto aos biomateriais, para detectar a presença dos marcadores osteopontina (OPN), e RUNX2.

As análises de imunoistoquímica foram realizadas por meio da técnica de detecção pela imunoperoxidase. Após a desparafinização dos cortes histológicos, a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio por 30 min. Em seguida, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) e o bloqueio da biotina endógena através de albumina bovina 1% e leite desnatado.

Os anticorpos primários utilizados foram contra as proteínas, osteopontina (OPN) e RUNX2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA). O controle negativo foi realizado por meio da omissão de anticorpos primários. Ainda, como controle positivo, foi utilizado a cortical hígida do osso parietal livre de defeito, para verificação da efetividade dos anticorpos utilizados. O anticorpo secundário usado foi o anticorpo biotinilado anti-rato (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). A Biotina avidina foi utilizada para amplificar o sinal de imunomarcacão e o cromógeno utilizado foi o Diaminobenzidina (Dako, Glostrup, Dinamarca). As amostras foram contra-coradas com solução de Hematoxilina Mayer. As imagens foram obtidas usando uma câmera acoplada ao microscópio de luz (Leica Reichert Diastar Produtos & Jung, Wetzlar, Alemanha).

A análise descritiva foi realizada por um único examinador treinado (RO), atribuindo escores para verificar a expressão das proteínas na região dos defeitos ósseos, a saber: (0) sem marcação (0% de células/matriz), (1) leve (<25% de células/matriz), (2) moderado (25-50% de células/matriz) e (3) intenso (>50% de células/matriz).

2.3 Análise de Expressão Gênica

No período de 15 dias, foram coletados o tecido ósseo, dos defeitos críticos, de 5 animais acrescentados para essa análise da expressão dos genes RUNX2, IBSP e VEGF.

Cada fragmento ósseo foi removido com a utilização de uma trefina de 7mm de diâmetro (Harte®, Ribeirão Preto/SP, Brasil), para contemplar com margem de segurança o defeito de 5mm. A remoção foi realizada sob constante irrigação de uma

solução resfriada de tampão fosfato-salino (PBS) e posteriormente acondicionados em criotubos de 2,0ml (Corning[®], Nova York, EUA), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em Freezer -80°C (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), para que o RNA total seja isolado com o auxílio do reagente Trizol (Life Technologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A extração do RNA foi realizada através do kit Promega (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)

O RNA foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop[®]2000 (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) e foi confeccionado o cDNA utilizando 1µg de RNA por meio da reação da transcriptase reversa (M-MLV: transcriptase reversa: High capacity (Waltham, Massachusetts, USA). A sequência dos primers foi amplificada e seus produtos foram submetidos a eletroforese com gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo e visualizados utilizando o software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA).

Por fim, o PCR em tempo real foi conduzido com base no sistema StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando o sistema de corantes fluorescentes para detecção SybrGreen (Primer Design Ltd, Southampton, UK) sob as condições cíclicas: 95° durante 10 minutos para a desnaturação primária, e 35 ciclos de 95° por 15 segundos para abertura das fitas e, finalmente, 60° por 60 segundos para anelamento dos primers e extensão dos fragmentos.

A expressão gênica foi calculada por referência à expressão das proteínas ribossomal mitocondrial e normalizada pela expressão gênica dos fragmentos das paredes do defeito no período de 15 dias.

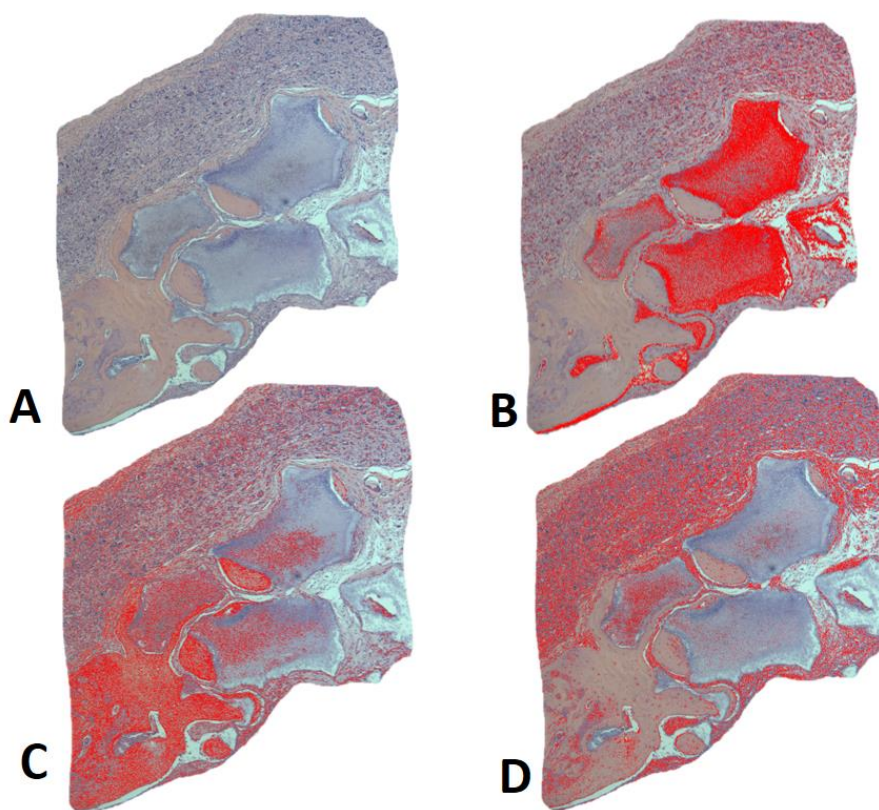
A expressão gênica dos demais grupos foi avaliada em relação à expressão do grupo controle, que neste estudo, foi a grupo PO, considerando que foi o material utilizado para o preenchimento de todos os defeitos, portanto, o grupo da PO apresenta um valor próximo a 1.0 (valor médio) e representa quantas vezes a expressão do gene analisado foi maior ou menor em relação à expressão do gene do grupo PO.

2.4 Análises de Histometria

Após verificada a correta desmineralização das peças, foram obtidos cortes de 6µm de espessura de cada peça, divididos em lâminas com 4 cortes cada, corados por hematoxilina-eosina.

A avaliação histométrica das peças foi realizada utilizando-se um microscópio de luz DIASTAR (Leica Reichert & Jung Products®, Germany), com objetivas para aumento de 5 vezes. As imagens representativas foram enviadas para um microcomputador, utilizando-se de uma câmera fotográfica digital (Leica Microsystems® DFC-300-FX – Alemanha), acoplada ao microscópio de luz comum, e salvas sob a extensão TIF. A determinação dos valores foi realizada empregando-se um software analisador de imagens ImageJ FIJI (Broken Symmetry® Software 1.43.76, USA). Um examinador treinado realizou a análise, tendo os cotos ósseos como referências e delimitando o defeito. A área foi delimitada usando o recurso de “mão livre” no próprio software e as áreas totais da amostra foram estabelecidas como 100%. Em seguida, foram mensuradas a quantidade de tecido ósseo, remanescente de biomaterial e tecido conjuntivo por meio da ferramenta de *threshold* de cores, e os espaços vazios foram subtraídos do cálculo quando presentes (Figura 4). A porcentagem de cada componente foi obtida pela média de duplicatas de cada defeito.

Figura 4. Histometria do Grupo Plenum® Guide + Plenum® Osshp no período de 60 dias, ilustrando, com destaque na cor vermelha, as mensurações por *Threshold* de cores, realizada pelo software ImageJ FIJI®, sendo: A: Imagem histológica original, na coloração de HE, sem filtros. B: Remanescentes de biomaterial. C: Tecido ósseo. D: Tecido conjuntivo. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



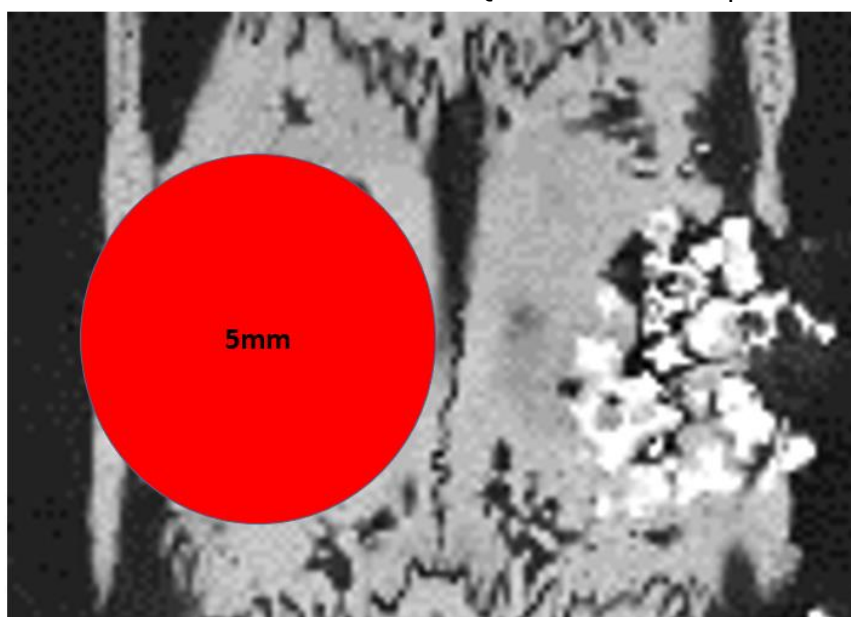
Fonte: Elaboração própria

2.5 Micro-CT

Para a aquisição das imagens foram adotadas uma resolução espacial 12 μm ; as imagens foram adquiridas com equipamento modelo Phoenix V |tome| x M Microfocus Scanner (General Electric Company®, Wunstorf, Germany) com ajuste de voltagem de 80 kV. Após as aquisições das imagens, os planos axial, coronal e sagital foram alinhados para identificar visualmente todas as regiões de interesse. Os volumes de interesse (VOIs) foram adquiridos por meio da reconstrução das imagens bidimensionais (2D) e a reconstrução das imagens volumétricas 3D foram obtidas com a utilização do software SkyScan, DataViewer® v. 1.4.1.

No CTAnalyser® (SkyScan v. 1.11.8.0), uma circunferência de 5.0mm, foi posicionada no centro das áreas dos defeitos e uma espessura de 1.0mm foi considerada para análise. Foi adotado um *threshold* de 105 (máximo) e 75 (mínimo) para a avaliação do tecido ósseo e de 255 (máximo) e 105 (mínimo) para a avaliação dos materiais regenerativos. Os valores dos parâmetros para os materiais regenerativos foram subtraídos dos valores obtidos para o tecido ósseo, para separar os volumes dos materiais regenerativos remanescentes do tecido ósseo neoformado (Figura 5).

Figura 5. A- Reconstrução 3D, Plano axial, com a delimitação da área de interesse, com mesmo diâmetro do defeito crítico de 5mm. Quirino, L.C, Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

Foram utilizados os seguintes parâmetros para a análise dimensional da microarquitetura do osso trabecular, baseado na nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone Mineral Research (2010)*: *Percent bone volume (BV/TV)*, *Trabecular number (Tb.N)*, *Trabecular separation (Tb.Sp)*, *Trabecular thickness (Tb.Th)* e: *Connectivity density (Com.nDn)*.

2.6 Análise Estatística

As mensurações foram tabuladas para avaliação estatística. Foram utilizados testes de comparação múltipla. Os dados coletados foram previamente submetidos a teste de normalidade e homogeneidade de variância para seleção dos testes estatísticos empregados. Para comparação dos dados foi considerado um poder de estudo de 80%, e um erro alfa de 5%.

2.6.1. Análise de PCR

A análise estatística para as amostras de PCR, utilizando como material regenerador controle a Plenum® Osshp, foi realizada comparando os valores médios e de desvio padrão (SD) entre os grupos. Os dados das avaliações para RUNX2, VEGF, IBSP foram submetidos ao pressuposto de normalidade e homogeneidade de variâncias. Foram utilizados testes ANOVA One-way, com pós-teste de Dunnett.

2.6.2. Análise de Histometria

Para as análises histométricas, todos os dados passaram no teste de normalidade de Shapiro-wilk e homocedasticidade de Levene, desta forma, foi utilizado o teste ANOVA *two-way* com pós teste de Tukey para as comparações entre os grupos e para a variante tempo (15, 30 e 60 dias).

2.6.3. Análise de μ CT

Para as análises relacionadas às análises da regeneração óssea guiada, os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de homocedasticidade de Levene. Mais de 50% dos grupos em cada parâmetro não respeitaram os critérios de distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p < 0,05$), desta forma a comparação entre os grupos foi realizada com testes não paramétricos. A comparação

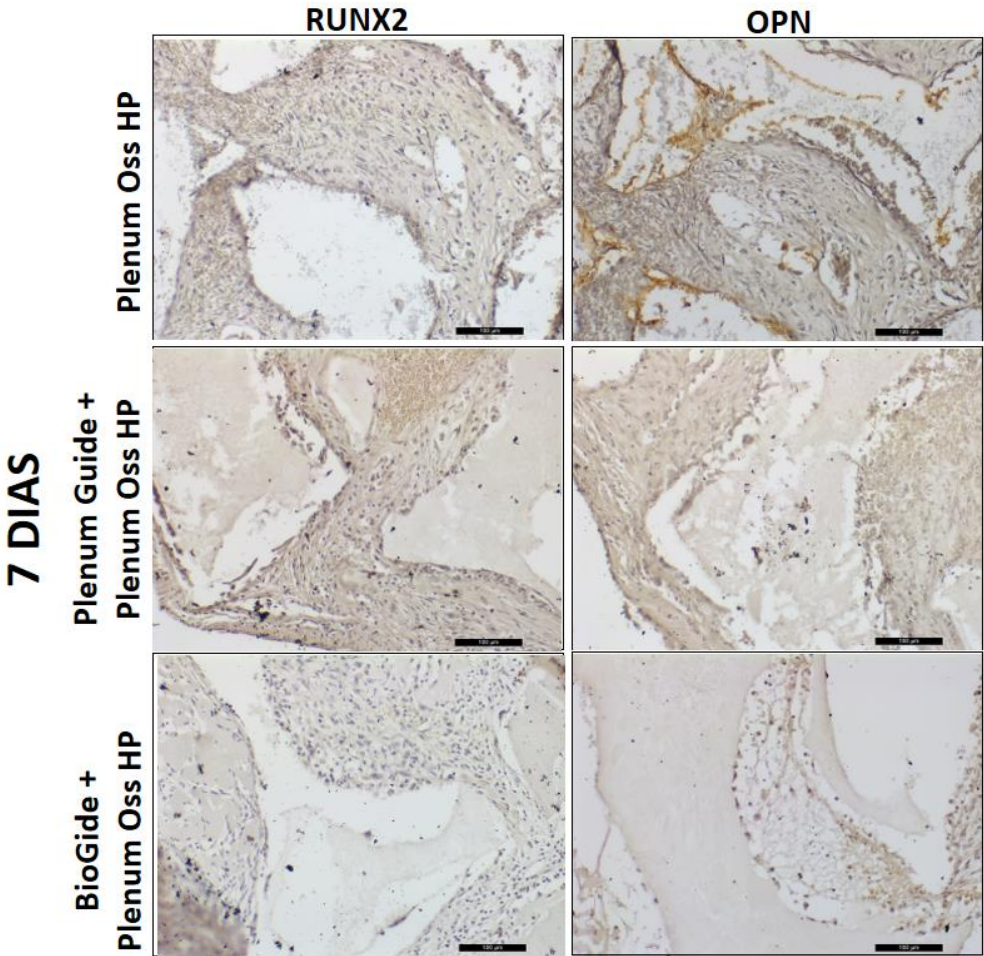
dos parâmetros no *threshold* de tecido ósseo neoformado foi realizado com teste de Kruskal-Wallis e o teste U-Mann-Whitney foi utilizado para a comparação dos parâmetros no *threshold* de remanescente de Biomaterial.

3 Resultados

3.1 Análise de Imunoistoquímica

No grupo PO, aos 7 dias, foi verificada uma imunomarcacão leve (1) na presença de RUNX2 no tecido conjuntivo próximo ao biomaterial, e igualmente leve (1) para OPN. No mesmo período, para o grupo PG, foi observado uma marcação moderada (2) para RUNX2 especialmente na área próxima ao biomaterial, bem como, uma imunomarcacão moderada (2) para a OPN, tanto em células da linhagem osteoblástica como na matriz extracelular. Já para o grupo BG, neste mesmo período, observamos uma leve (1) imunomarcacão de RUNX2 nas células da linhagem osteoblástica, sendo igualmente leve (1) para OPN, presentes especialmente em células da linhagem osteoblástica (Figura 6). Os dados estão resumidos na tabela 1.

Figura 6. Painel da imunohistoquímica evidenciando as marcações das proteínas OPN e RUNX para todos os grupos no período de 7 dias. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

Tabela 1. Score das imunomarcações. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

Grupos	RUNX2	OPN
PO	1	1
PG	2	2
BG	1	1

Fonte: Elaboração própria

3.2 Expressão Gênica

Os grupos PG e BC foram avaliados em relação à expressão gênica do grupo PO, com um valor próximo a 1. O valor médio apresentado pelo grupo PG e BG representa quantas vezes a expressão do gene analisado foi maior ou menor em relação à expressão do gene do grupo PO.

3.2.1 RUNX2

O grupo PG (2.35 ± 0.22) apresentou uma menor expressão quando comparado com o grupo BG (6.89 ± 0.06), porém sem diferença estatística com o grupo PO (1.66 ± 0.97). Tabela 2.

Tabela 2 - Análise da expressão gênica de RUNX2 para a análises dos biomateriais regenerativos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

PO	RUNX2	
	PG	BG
$1,66 \pm 0.97^a$	$2,35 \pm 0.22^a$	$6,89 \pm 0.06^b$

Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos. ANOVA One-way, e pós teste de Tukey. Fonte: Elaboração própria.

3.2.2 VEGF

O grupo PG (12.4 ± 0.88) apresentou uma maior expressão em relação ao grupo BG (3.06 ± 2.70) e ao grupo PO (2.35 ± 0.14). Tabela 3.

Tabela 3 - Análise da expressão gênica de VEGF para a análises dos biomateriais regenerativos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

PO	VEGF	
	PG	BG
$2,35 \pm 0.14^a$	$12,4 \pm 0.88^b$	$3,06 \pm 2.70^a$

Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos. ANOVA One-way, pós-teste de Dunnett e pós teste de Tukey. Fonte: Elaboração própria.

3.2.3 IBSP

O grupo PG (3.77 ± 0.02) apresentou uma menor expressão em relação ao grupo BG (6.25 ± 0.20), porém, com uma maior expressão quando comparado ao grupo PO (2.34 ± 0.15). Tabela 4.

Tabela 4 - Análise da expressão gênica de IBSP para a análises dos biomateriais regenerativos. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

Po	IBSP PG	BG
$2,34 \pm 0.15^a$	$3,77 \pm 0.02^b$	$6,25 \pm 0.20^c$

Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos. ANOVA One-way, pós-teste de Dunnett. Fonte: Elaboração própria.

3.3 Análise de Histometria

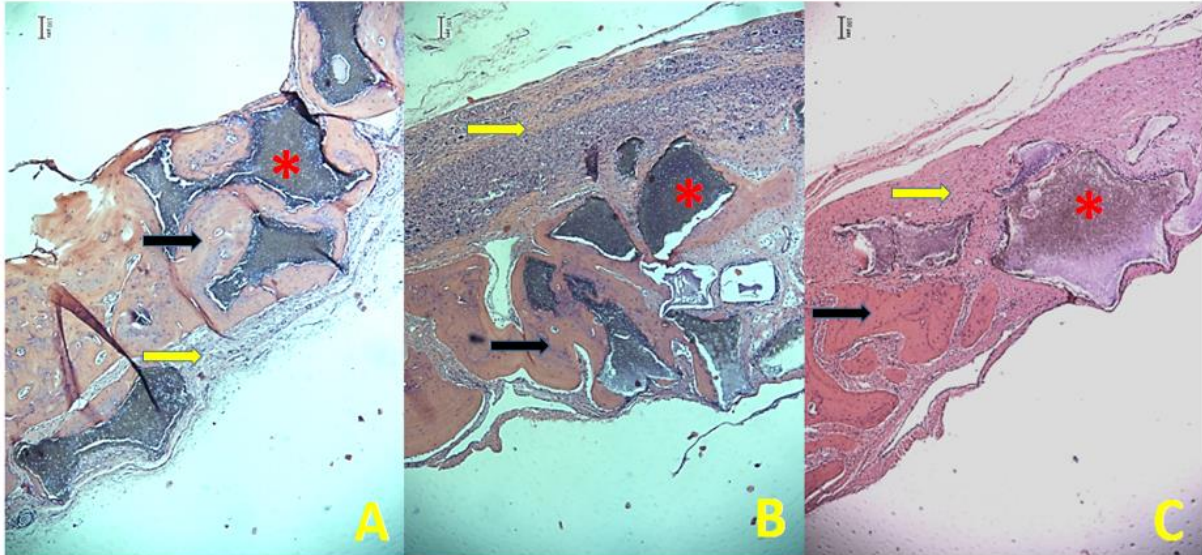
Foram analisados quantitativamente em porcentagem volumétrica, o tecido ósseo neoformado, tecido conjuntivo e remanescente dos biomateriais regenerativos, das amostras avaliadas (tabela 1).

No período de 15 e 30 dias, houve um maior percentual de tecido conjuntivo no grupo PG quando comparado ao grupo BG ($p < 0,05$), e que em 60 dias, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Em comparação com o grupo PO, foi observado diferença estatística apenas no período de 15 dias ($1,63 \pm 0,36$ *versus* $0,82 \pm 0,43$), porém, sendo semelhante nos períodos de 30 e 60 dias.

Em relação ao percentual de tecido ósseo, o grupo PG apresentou um percentual semelhante ao do BG ($p > 0,05$).

O grupo PG quanto ao percentual de remanescentes de materiais, foi notado um maior percentual de remanescentes quando comparado ao grupo BG no período de 15 dias ($1,07 \pm 0,4$ *versus* $0,51 \pm 0,08$), porém, no período de 30 e 60 dias, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre esses períodos ($p > 0,05$). Figura 7. Todos os dados tabulados estão descritos na Tabela 5.

Figura 7. Cortes histológicos em microscopia de luz, com aumento de 5x nos períodos de 60 dias de cada condição experimental a saber: asterisco: Biomaterial remanescente, seta preta: Tecido ósseo; seta amarela: tecido conjuntivo. A). Grupo Plenum® Osshp. B). Grupo Plenum® Guide + Plenum Osssp C). Grupo BioGide® + Plenum® Osshp. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 5. Análise histométrica dos grupos, nos diferentes períodos avaliados (conjuntivo, osso neoformado e biomaterial remanescente). Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

Tecido Conjuntivo			
	G1 Plenum® Osshp	G2 Plenum® Guide + Plenum® Osshp	G3 BioGide® + Plenum® Osshp
15 dias	0,82 (0,43)b	1,63 (0,36)a	0,86 (0,17)b
30 dias	0,44 (0,17)a	1,32 (0,53)ab*	0,81 (0,2)b
60 dias	0,80 (0,18)b	0,83 (0,45)b	0,70 (0,34)b

Tecido Ósseo Neoformado			
	G1 Plenum® Osshp	G2 Plenum® Guide + Plenum® Osshp	G3 BioGide® + Plenum® Osshp
15 dias	0,64 (0,3)a	0,38 (0,26)a	0,21 (0,11)a
30 dias	0,45 (0,11)a	0,40 (0,23)a	0,68 (0,21)a
60 dias	0,64 (0,3)a	0,60 (0,24)a	0,65 (0,51)a

Biomaterial Remanescente			
	G1 Plenum® Osshp	G2 Plenum® Guide + Plenum® Osshp	G3 BioGide® + Plenum® Osshp
15 dias	0,68 (0,3)ab	1,07 (0,4)a	0,51 (0,08)b
30 dias	0,56 (0,17)a	0,87 (0,36)a	0,78 (0,26)a
60 dias	0,78 (0,32)a	0,84 (0,31)a	0,91 (0,33)a

*Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os Grupos. Fonte: Elaboração própria.

3.4 Micro –CT

3.4.1 Threshold para tecido mineralizado

Para os parâmetros **BV/TV**, **TbN**, e **TbTh**, observamos que não houve diferenças estatísticas significativas entre todos os grupos avaliados ($p>0,05$).

Para **TbSp**, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos PG, 0,36 (0,3-0,48) e o grupo BG 0,37 (0,33-0,6), porém, apresentou uma separação entre as trabéculas quando comparado ao grupo PO 0,47 (0,35-0,59).

Para o parâmetro **ConnDn**, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos PG 70,28 (1,86-134,84) e grupo BG (26,42 (0,58-57,16). O defeito

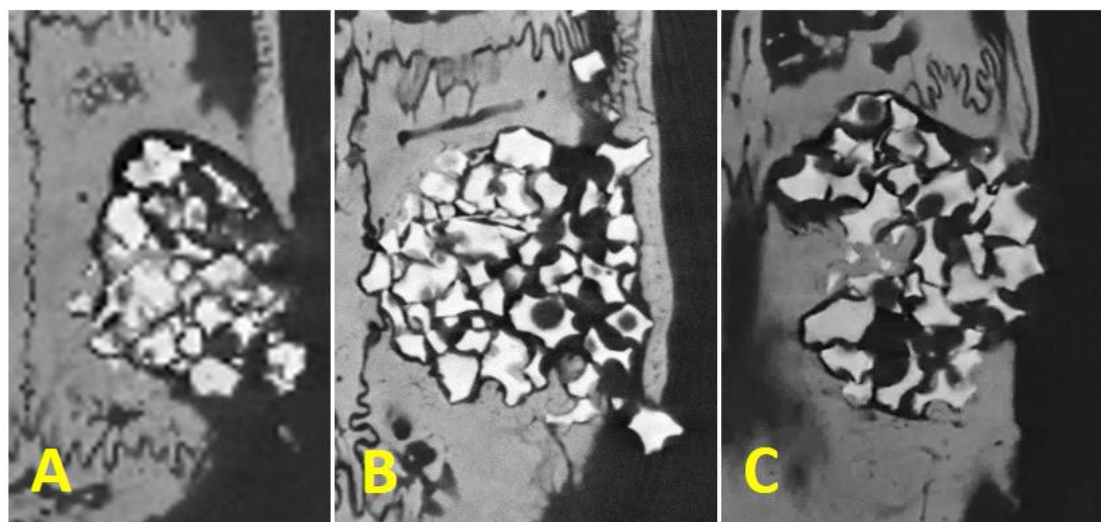
preenchido com apenas com PO 26,74 (2,18-51,3) apresentou uma menor densidade de conexões média entre as trabéculas quando comparado com o grupo PG. Tabela 6. Figura 8.

Tabela 6. Parâmetros microtomográficos para o *threshold* de tecido ósseo neoformado nos diferentes grupos de análise. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

Parâmetro	Plenum® Osshp	BioGide®+ Plenum® Osshp	Plenum®Gide+ Plenum® Osshp
BV/TV (%).	10,93 (7,93-13,93) ^a	13,00 (8,92-22,94) ^a	10,52 (7,28-31,5) ^a
Tb.N (mm⁻¹).	1,58(1,23-1,93) ^b	2,10 (0,72-2,52) ^a	2,23 (1,18-2,9) ^a
Tb.Th (mm).	0,07 (0,05-0,09) ^a	0,07 (0,05-0,29) ^a	0,05 (0,04-0,27) ^a
Tb.Sp (mm).	0,47 (0,35-0,59) ^a	0,37 (0,33-0,6) ^a	0,36 (0,3-0,48) ^a
Conn.Dn (mm⁻³).	26,74 (2,18-51,3) ^b	26,42 (0,58-57,16) ^a	70,28 (1,86-134,84) ^a

*Letra minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as linhas. (Kruskal-Wallis/Anova Two-way com normalização Gaussiana). Fonte: Elaboração própria.

Figura 8. Tecido mineralizado no interior do defeito crítico permeando os grânulos dos biomateriais sendo A- Plenum® Osshp, B- Plenum® Guide + Plenum® Osshp e C- BioGide® + Plenum® Osshp. Quirino, LC, Araraquara, 2022.



Fonte: Elaboração própria

3.4.2. Threshold para remanescente de material regenerador

Os mesmos parâmetros (BV/TV, TbN, TbTh, TbSp e ConnDN) foram avaliados com ajuste para remanescente do biomaterial Plenum® Osshp, não foram encontradas diferenças estatísticas para nenhum dos parâmetros entre todos os grupos analisados. Na Tabela 7 estão resumidos todos os dados, apresentados como mediana (valor mínimo - valor máximo).

Tabela 7. Parâmetros microtomográficos para o biomaterial remanescente nos diferentes grupos de análise. Quirino, L.C. Araraquara, 2022.

Parâmetros Biomaterial	<i>Plenum</i> ® <i>Osshp</i>	<i>Plenum</i> ® <i>Guide+Plenum</i> ® <i>Osshp</i>	<i>BioGide</i> ®+ <i>Plenum</i> ® <i>Osshp</i>
<i>BV/TV (%)</i>	25,63 (16,5-34,76) ^b .	40,72 (0,06-53,1) ^a	38,06 (0-43,75) ^a .
<i>Tb.N (mm⁻¹)</i>	0,80 (0,59-1,01) ^a .	1,15 (0,01-1,74) ^a .	1,04 (0-1,27) ^a .
<i>Tb.Th (mm)</i>	0,32 (0,27-0,37) ^a .	0,31 (0,05-0,4) ^a .	0,36 (0-0,39) ^a .
<i>Tb.Sp (mm)</i>	0,55 (0,42-0,68) ^a .	0,38 (0,29-0,98) ^a .	0,43 (0,38-1,03) ^a .
<i>Conn.Dn (mm⁻³)</i>	4,64 (1,84-7,44) ^b .	6,12 (0,44-28,72) ^a .	3,86 (0-8,08) ^a .

Fonte: Elaboração própria

4. Discussão

O objetivo desse estudo foi avaliar o processo de reparo ósseo com uso de membrana absorvível, composta por polidioxanona, com relação a neoformação óssea, presença de tecido conjuntivo e de remanescentes de biomateriais, por meio das análises de histometria, expressão gênica, imunoistoquímica e de microtomografia computadorizada, defeitos críticos, em calvárias de ratos, tendo como controle positivo outra membrana absorvível, Geistlich BioGide® e como controle negativo, um outro defeito com o mesmo preenchimento, porém, sem o recobrimento por membranas.

As membranas absorvíveis apresentam vantagens em relação às não absorvíveis por apresentarem uma maior permeabilidade e nutrição ao tecido adjacente, além de não necessitar de um procedimento cirúrgico adicional para sua remoção. Os materiais sintéticos são preferencialmente utilizados para ROG devido à sua menor imunorreatividade quando comparado aos materiais homogêneos e heterogêneos (Le *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2016; Saska *et al.*, 2021).

A polidioxanona é um polímero sintético, amplamente utilizado em fios de sutura e em membranas/folhas para o fechamento de perfuração de septo nasal, comunicação oro-nasal e reconstrução de soalho de órbita com altos índices de sucesso. Seifert *et al.*; em 2021, realizaram um estudo retrospectivo com 1594 pacientes e avaliaram dados epidemiológicos e tipos de tratamentos das reconstruções das fraturas do assoalho orbitário, e observaram que, a polidioxanona foi o material mais utilizado, em 77, 3% dos casos, e com as menores taxas de complicações pós-operatório quando comparado com as malhas de titânio, indicando o uso das membranas de polidioxanona de 0,15 mm em defeitos de até 200mm². (Ahmed *et al.*; 2013; Sand *et al.*; 2015; Kruber *et al.*; 2018, Seifert *et al.*; 2021).

Para que o novo osso seja formado, os materiais regenerativos devem ser primeiramente absorvidos, e o tempo de absorção da membrana é um fator importante a ser analisado, pois caso ocorra antes da neoformação óssea, pode causar a perda da estabilidade dimensional e a dissipação do enxerto, prejudicando o reparo ósseo, ou, caso haja uma demora na sua absorção, pode ser prejudicial devido a formação de produtos de degradação de uma membrana não funcional. Sendo assim, um período mínimo de 3 a 4 semanas é o ideal para garantir a migração, diferenciação e

maturação das células que formam a matriz óssea (Dacache *et al.*, 2020; Danielitto-Zana *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2020).

Para a avaliação da função das membranas como barreira, foi utilizada a quantificação de tecido conjuntivo realizada por meio de histometria. Ao compararmos os grupos PO e PG, foi observado que houve uma maior quantidade de tecido conjuntivo no grupo PG nos períodos iniciais de 15 e 30 dias em relação ao grupo da PO, mas que no período final de 60 dias, essa quantidade foi semelhante. Esses resultados indicam que em um momento inicial, provavelmente a membrana PG apresente uma maior reabsorção, gerando micro lacunas, permitindo uma maior invasão e formação de tecido conjuntivo, e essa maior permeabilidade da PG precocemente, também favorece a angiogênese, como visto por uma maior expressão de VEGF no grupo PG em relação ao grupo BG (Danielitto-Zana *et al.*, 2020)

Quando comparamos entre os grupos recobertos por membranas, observamos que, no período inicial de 15 dias, o grupo PG continuou apresentando uma maior quantidade de tecido conjuntivo formado, porém, em 30 e 60 dias essa quantidade foi semelhante. Esses resultados estão provavelmente relacionados com a taxa de degradação gradual do suporte, dependente da natureza polimérica do biomaterial, sendo de origem distintas, uma sintética, PG, composta por polidioxanona versus a outra de origem animal, colágeno porcino, BG, além da espessura, pH e temperatura ambiente. No estudo realizado por Saska *et al.*, em 2021, ao analisarem a bioreabsorvibilidade e biodegradabilidade dos materiais poliméricos, e observaram que a degradação gradual do suporte promove um aumento no tamanho dos poros, permitindo uma maior taxa de proliferação e migração celular para substituição subsequente pelo tecido recém-formado. (Saska *et al.*, 2021).

Quando a neoformação óssea foi avaliada pela análise de histometria, observamos que, na comparação entre os grupos PO e PG, embora no período de 15 dias houve uma menor quantidade no grupo PG, não observamos diferenças estatísticas significantes entre os grupos nos demais períodos, fato observado também na análise de microtomografia computadorizada, na qual mostrou que a proporção de volume ósseo foi semelhante no período de 60 dias entre os grupos, confirmando os achados da histometria. Ainda na avaliação microtomográfica, observamos que a microarquitetura do tecido ósseo dos defeitos recobertos por membranas, apresentaram um maior número e densidade de conectividade entre as trabéculas ósseas, sugerindo que a membrana permitiu a formação de um tecido com

características mais medular, com maior resistência e mineralização do que o tecido ósseo formado sem o recobrimento por membranas.

No estudo realizado por Nooh *et al.*, 2016, com avaliação microtomográfica em calvárias de ratos, comparando os defeitos recobertos com BioGide, BioGide+ Bio Oss ou somente preenchido com Bio Oss, observaram que os defeitos do grupo BioGide + Bio Oss apresentaram um maior volume médio e maior densidade de conectividade do tecido ósseo neoformado em relação aos demais grupos, indo de encontro com os nossos resultados, que embora o volume ósseo entre os grupos PO e PG tenham sido semelhantes, o grupo PG apresentou um maior valor de ConnDn, indicando que além da função de estabilização do enxerto, a membrana auxiliou na mineralização do biomaterial enxertado (Nooh *et al.*, 2016).

Durante o reparo do defeito, o osso neoformado deve desenvolver características de osso maduro, aumentando a espessura das trabéculas e diminuindo os espaços trabeculares, no presente estudo não observamos diferenças para esses parâmetros entre todos os grupos avaliados, indicando que houve uma formação de tecido ósseo semelhante em todos os grupos. Danielito-Zanna *et al.*; em 2020, realizaram um estudo com defeitos críticos de 7mm, em calvária de ratos, com três diferentes membranas, Gen Derm®, Gem Derm Flex® e BioGide®, e observaram uma neoformação óssea na periferia e no centro dos defeitos, que foi semelhante nos períodos de 30 e 60 dias no grupo BioGide, no entanto, o tecido neoformado preencheu quase toda a cavidade no período de 60 dias, além de observarem remanescentes da membrana e de tecido conjuntivo fibroso bem organizado, relacionados a um alto nível de desempenho no processo de reparo ósseo (Danielito-Zanna *et al.*; 2020).

A membrana atrai células de diferentes fenótipos, que expressam e secretam sequencialmente fatores relacionados com a regeneração e remodelação óssea, como as BMP-2, TGF- β , e de vascularização (VEGF). Os compartimentos da membrana promovem a expressão de fatores quimiotáticos e modulam os processos osteogênicos e de remodelação nos defeitos ósseos tratados, principalmente nos eventos ocorridos abaixo da membrana. Esses processos induzidos pela membrana, resultam em uma formação mais acelerada de tecido ósseo (Turri *et al.*, 2016)

Quando avaliamos a neoformação óssea pela análise de expressão gênica, observamos que o grupo PG apresentou uma menor expressão para os genes relacionados com a diferenciação osteoblástica (RUNX2) e à mineralização da matriz

óssea (IBSP) quando comparado com o grupo BG, apresentando resultados conflitantes com os obtidos pelas análises de histometria e microtomografia, que não evidenciaram diferença na quantidade ou qualidade do tecido ósseo neoformado. A superexpressão de IBSP aumenta a expressão gênica relacionada aos osteoblastos, bem como a incorporação de cálcio e à formação de ilhas de calcificações por culturas de osteoblastos, sendo esperado, portanto, uma maior mineralização no grupo BG, resultado divergente do obtido pela análise de microtomografia, que evidenciou semelhanças entre a maturidade do tecido ósseo, embora a expressão para a angiogênese (VEGF) tenha sido maior na grupo PG, um resultado importante, pois garante uma nutrição e oferta de células para a região do defeito ósseo (Gordon *et al.*, 2007).

Quando a comparação foi realizada entre os grupos PO versus PG, observamos que os defeitos recobertos pela PG apresentaram uma maior expressão de IBSP e VEGF, indicando uma maior angiogênese e maior mineralização do tecido ósseo neoformado, resultado compatível com o obtido pela análise de microtomografia, que evidenciou uma maior densidade de conectividade entre as trabéculas ósseas, porém, sem diferenças entre as expressões para RUNX2, como mostrado pela proporção semelhante de volume ósseo na avaliação microtomográfica.

A maior expressão de IBSP, por ser considerado um marcador inicial de osteoblastos e pela sua capacidade de se ligar aos cristais de hidroxiapatita, desempenha um papel importante nos estágios iniciais da mineralização óssea, e a sua expressão elevada na matriz extracelular indica tecido ósseo maduro ou com maior atividade de neoformação óssea, como o observado pela maior expressão no grupo PG em comparação ao grupo PO e menor quando comparado com o grupo BG (dos Santos Trento *et al.*, 2021)

Ainda na análise de biologia molecular, observamos que uma maior imunomarcagem no grupo PG em relação aos demais grupos, tanto para RUNX2 e OPN, dois marcadores relacionados com o início da mineralização óssea, indicando condições celulares iniciais mais favoráveis no grupo PG. Estes resultados vão de encontro com os observados no estudo realizado por Danielito-Zanna *et al.*; em 2020, com uma imunomarcagem leve para OPN no grupo BG no período de 30 dias (Danielito-Zanna *et al.*; 2020).

Os remanescentes dos biomateriais são itens importantes a serem avaliados, pois precisa ocorrer a substituição gradual dos biomateriais por tecido ósseo neoformado. Devido às membranas serem absorvíveis, não é possível diferenciar os remanescentes da membrana das partículas do enxerto, pois são absorvidas e integradas ao tecido conjuntivo. Diante disso, observamos que os remanescentes dos biomateriais foram semelhantes entre os grupos BG e PG, nas análises de histometria e microtomografia, diferindo apenas por uma maior quantidade desses remanescentes no grupo da Plenum Guide no período de 15 dias na análise de histometria. Quando comparado os remanescentes nos PO versus PG, observamos que, o grupo PG, apresentou uma maior quantidade desses remanescentes nos períodos de 15 e 30 dias, entretanto, sem diferenças aos 60 dias nas análises histométricas, divergindo dos resultados obtidos pela microtomografia no mesmo período de 60 dias, que mostrou uma maior proporção de volume desses remanescentes. Esses resultados indicam que a presença da membrana retarda a absorção do enxerto nos períodos iniciais, porém, com o passar do tempo, conforme ocorre a sua reabsorção, a quantidade de biomaterial remanescente é semelhante, evidenciando a propriedade de barreira da membrana, pois quando os defeitos foram recobertos pela membrana, os remanescentes foram semelhantes, porém, mostrando que o grupo PG apresentou uma maior quantidade desses remanescentes no período inicial, garantindo maior quantidade de biomaterial no leito receptor.

É fundamental verificar as propriedades da membrana utilizada em cada caso, atendendo as necessidades de cada paciente, facilitando o planejamento e garantindo que os resultados pretendidos sejam alcançados.

5. Conclusão

Por meio da metodologia aplicada neste estudo, podemos concluir que a membrana Plenum® Guide, é uma opção de membrana sintética, absorvível e eficaz na regeneração óssea guiada.

Agradecimentos

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

Os autores agradecem à empresa M3 Health® pela doação dos biomateriais e suporte no presente trabalho.

Nota*: O presente trabalho se baseou na tese de doutorado da aluna Lilian Caldas Quirino, do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia - Campus de Araraquara.

5. Referências

1. Ahmed A, Gibson C, Ayliffe P. Use of polydioxanone sheet to repair palatal fistulas in patients with cleft palate. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Oct;51(7): e197-8. doi: 10.1016/j.bjoms.2012.05.016. Epub 2012 Jul 1. PMID: 22749618.
2. Beck-Broichsitter BE, Acar C, Kandzia C, Jochens A, Wiltfang J, Becker ST. Reconstruction of the orbital floor with polydioxanone: a long-term clinical survey of up to 12 years. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Oct;53(8):736-40. doi: 10.1016/j.bjoms.2015.05.010. Epub 2015 Jun 6. PMID: 26051867.
3. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141. PMID: 20533309
4. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17(Suppl): 136–159
5. Chiapasco M, Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(Suppl): 113–123
6. Dacache-Neto AM, Sartoretto SC, Duarte IM, Resende RFB, Neves Novellino Alves AT, Mourão CFAB, Calasans-Maia J, Montemezzi P, Tristão GC, Calasans-Maia MD. In Vivo Comparative Evaluation of Biocompatibility and

- Biodegradation of Bovine and Porcine Collagen Membranes. *Membranes* (Basel). 2020 Dec 15;10(12):423. doi: 10.3390/membranes10120423. PMID: 33333940; PMCID: PMC7765348.
7. Danieleto-Zanna CF, Bizelli VF, Ramires GADA, Francatti TM, de Carvalho PSP, Bassi APF. Osteopromotion Capacity of Bovine Cortical Membranes in Critical Defects of Rat Calvaria: Histological and Immunohistochemical Analysis. *Int J Biomater*. 2020 Feb 18;2020: 6426702. doi: 10.1155/2020/6426702. PMID: 32148506; PMCID: PMC
 8. Dos Santos Trento G, Hassumi JS, Buzo Frigério P, Farnezi Bassi AP, Okamoto R, Gabrielli MAC, Pereira-Filho VA. Gene expression, immunohistochemical and microarchitectural evaluation of bone formation around two implant surfaces placed in bone defects filled or not with bone substitute material. *Int J Implant Dent*. 2020 Dec 1;6(1):80. doi: 10.1186/s40729-020-00279-7. PMID: 33258065; PMCID: PMC7704835.
 9. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*. 2017; 125: 315–337
 10. Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone*. 2007 Sep;41(3):462-73. doi: 10.1016/j.bone.2007.04.191. Epub 2007 May 6. PMID: 17572166.
 11. Goonoo N, Jeetah R, Bhaw-Luximon A, Jhurry D. Polydioxanone-based biomaterials for tissue engineering and drug/gene delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015; 97: 371-91
 12. Hakimi O, Murphy R, Stachewicz U, Hislop S, Carr AJ. An electrospun polydioxanone patch for the localisation of biological therapies during tendon repair. *Eur Cell Mater* 2012; 24:344–357; discussion 357.
 13. Ignatius AA, Ohnmacht M, Claes LE, Kreidler J, Palm F. A composite polymer/tricalcium phosphate membrane for guided bone regeneration in maxillofacial surgery. *Journal of biomedical materials research*. 2001;58(5):564-9
 14. Kruber D, Hierl T, Doerfler HM, Huempfner-Hierl H, Krause M. Preforming of polydioxanone sheets for orbital wall fractures - A technical note. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018 Jul;46(7):1159-1161. doi: 10.1016/j.jcms.2018.05.007. Epub 2018 May 9. PMID: 29793778.
 15. Le. L Guehennec, P. Layrolle, G. Daculsi, A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mater*. 2004; 2004:1-10
 16. Li X, Guo B, Xiao Y, Yuan T, Fan Y, Zhang X. Influences of the steam sterilization on the properties of calcium phosphate porous bioceramics. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(1):1–10
 17. Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 2005; 26:5158–5166

18. Nooh N, Ramalingam S, Al-Kindi M, Al-Rasheed A, Al-Hamdan KS, Al-Hezaimi K. Real-Time Assessment of Guided Bone Regeneration in Standardized Calvarial Defects in Rats Using Bio-Oss With and Without Collagen Membrane: An In Vivo Microcomputed Tomographic and Histologic Experiment. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2016;36 Suppl: s139-49. doi: 10.11607/prd.4354. PMID: 27031628
19. Sabino MA, González S, Márquez L, Feijoo JL. Study of the hydrolytic degradation of polydioxanone PPDx. *Polym Degrad Stab.* 2000;69(2):209–216
20. Saska S, Pilatti L, Silva ESS, Nagasawa MA, Câmara D, Lizier N, Finger E, Dyszkiewicz Konwińska M, Kempisty B, Tunchel S, Blay A, Shibli JA. Polydioxanone-Based Membranes for Bone Regeneration. *Polymers (Basel).* 2021 May 21;13(11):1685. doi: 10.3390/polym13111685. PMID: 34064251; PMCID: PMC8196877.
21. Saska S, Pilatti L, Blay A, Shibli JA. Bioresorbable Polymers: Advanced Materials and 4D Printing for Tissue Engineering. *Polymers (Basel).* 2021 Feb 13;13(4):563. doi: 10.3390/polym13040563. PMID: 33668617; PMCID: PMC7918883.
22. Sand JP, Desai SC, Branham GH. Septal Perforation Repair Using Polydioxanone Plates: A 10-Year Comparative Study. *Plast Reconstr Surg.* 2015 Oct;136(4):700-703. doi: 10.1097/PRS.0000000000001571. PMID: 26397247.
23. Seifert LB, Mainka T, Herrera-Vizcaino C, Verboket R, Sader R. Orbital floor fractures: epidemiology and outcomes of 1594 reconstructions. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2021 Jun 14. doi: 10.1007/s00068-021-01716-x. Epub ahead of print. PMID: 34128084.
24. Souza EQM, Costa Klaus AE, Espósito Santos BF, Carvalho da Costa M, Ervolino E, Coelho de Lima D, Fernandes LA. Evaluations of hydroxyapatite and bioactive glass in the repair of critical size bone defects in rat calvaria. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020 Oct-Dec;10(4):422-429. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.07.014. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32775186; PMCID: PMC740377.
25. Turri A, Elgali I, Vazirisani F, Johansson A, Emanuelsson L, Dahlin C, Thomsen P, Omar O. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. *Biomaterials.* 2016 Apr; 84:167-183. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.034. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26828682

4 CONCLUSÃO

Por meio da metodologia empregada neste estudo, foi possível concluir que:

1. O Plenum® Osshp, demonstrou ser eficaz no processo de reparo ósseo, além de preencher com maior facilidade os defeitos críticos, sendo semelhante ao controle comercial, sendo considerado uma opção eficaz como substituto ósseo sintético na clínica em implantodontia.
2. O Plenum® Oss β -TCP, dentro dos parâmetros avaliados, apresentou resultados semelhantes na comparação com o biomaterial padrão, demonstrando condições celulares iniciais mais favoráveis que o controle positivo.
3. A membrana Plenum® Guide, é uma opção de membrana sintética, absorvível e eficaz na regeneração óssea guiada.

REFERÊNCIAS*

1. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005; 36(3): 20-7.
2. O'Keffe RJ, Tyiapatnanaputi P, Xie C, Li TF, Clark C, Zuscik MJ, et al. COX-2 has a critical role during incorporation of structural bone allografts. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1068: 532-42.
3. Peñarrocha-Oltra D, Demarchi CL, Maestre-Ferrín L, Peñarrocha-Diago M, Peñarrocha-Diago M. Comparison of immediate and delayed implants in the maxillary molar region: a retrospective of 123 implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012; 27: 604-10.
4. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014; 14: 15-56.
5. Sommerfeldt D, Rubin C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*. 2001; 10: 86-95.
6. Chiarello E, Cadossi M, Tedesco C, Capra P, Calamelli C, Shehu A, Giannini S. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. *Aging Clin Exp Res*. 2013; 25: 101-3.
7. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2004; 362: 2821-50.
8. Filvaroff EH. VEGF and bone. *J Musculoskel Neuron Interact*. 2003; 3(4): 304-7.
9. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 85(3): 777-86.
10. Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects. *J Periodontol*. 1992; 63: 729-35.
11. Ebrahimi M, Pripatnanont P, Suttapreyasri S, Monmaturapoj N. In vitro biocompatibility analysis of novel nano-biphasic calcium phosphate scaffolds in different composition ratios. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2014; 102(1): 52-61.
12. Yang C, Unursaikhan O, Lee JS, Jung UW, Kim CS, Choi SH. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2014; 102(1):80-8.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver.

13. Kakar A, Rao BHS, Hegde S, Deshpande N, Lindner A, Nagursky H, et al. Ridge preservation using an in situ hardening biphasic calcium phosphate (β -TCP/HA) bone graft substitute—a clinical, radiological, and histological study. *Int J Implant Dent*. 2017; 3(1): 25.
14. Gerike W, Bienengräber V, Henkel KO, Bayerlein T, Proff P, Gedrange T, et al. The manufacture of synthetic non-sintered and degradable bone grafting substitutes. *Folia Morphol (Warsz)*. 2006; 65(1): 54–5.
15. Lee JH, Ryu MY, Baek H-R, Lee KM, Seo J-H, Lee H-K. Fabrication and evaluation of porous Beta-Tricalcium Phosphate/hydroxyapatite (60/40) composite as a bone graft extender using rat calvarial bone defect model. *Sci World J*. 2013; 2013:1–9.
16. Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancret F, Bouler JM. Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomater*. 2014; 10(3): 1035–49.
17. Ebrahimi M, Botelho MG, Dorozhkin S V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Mater Sci Eng C*. 2017; 71: 1293–312.
18. Saska S, Mendes LS, Gaspar AMM, Capote TSDO. Bone substitute materials in implant dentistry. In: Turkyilmaz I. *Current concepts in dental implantology*. Croatia: INTECH; 2015. p. 158-67.
19. Jensen SS, Bornstein MM, Dard M, Bosshardt DD, Buser D. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 90(1):171-81.
20. Lobo SE, Arinzeh TL. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone regeneration and tissue engineering applications. *Materials (Basel)*. 2010; 3(2): 815–26.
21. Lim H-C, Zhang M-L, Lee J-S, Jung U-W, Choi S-H. Effect of different hydroxyapatite: β -tricalcium phosphate ratios on the osteoconductivity of biphasic calcium phosphate in the rabbit sinus model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015; 30(1): 65–72.
22. Le Guéhennec L, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mater*. 2004. 8: 1-10; discussion 10-1.
23. Einhorn TA. Enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77: 940-56.
24. Saska S, Barud HS, Gaspar AM, Marchetto R, Ribeiro SJ, Messaddeq Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. *Int J Biomater*. 2011; 175362.

25. Li X, Guo B, Xiao Y, Yuan T, Fan Y, Zhang X. Influences of the steam sterilization on the properties of calcium phosphate porous bioceramics. *J Mater Sci Mater Med*. 2016; 27(1): 1–10.
26. Brogginini N, Bosshardt DD, Jensen SS, Bornstein MM, Wang CC, Buser D. Bone healing around nanocrystalline hydroxyapatite, deproteinized bovine bone mineral, biphasic calcium phosphate, and autogenous bone in mandibular bone defects. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2015; 103(7): 1478–87.
27. Macedo RM, Lacerda SA, Okamoto R, Shahdad S, Brentegani LG. vital bone formation after grafting of autogenous bone and Biphasic Calcium Phosphate bioceramic in extraction sockets of rats: histological, histometric, and immunohistochemical evaluation. *Implant Dent*. 2018; 27(6): 615-22.
28. Fernández RF, Bucchi C, Navarro P, Beltrán V, Borie E. Bone grafts utilized in dentistry: an analysis of patients' preferences. *BMC Med Ethics*. 2015; 16(1): 71.
29. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17(Suppl): 136–59.
30. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*. 2017; 125: 315-37.
31. Chiapasco M, Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(Suppl): 113-23.
32. Turri A, Elgali I, Vazirisani F, Johansson A, Emanuelsson L, Dahlin C, et al. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. *Biomaterials*. 2016; 84: 167-83.
33. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TM, Kowolik MJ, Janowski GM. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—a materials perspective. *Dent Mater* 2012; 28: 703–21.
34. Ignatius AA, Ohnmacht M, Claes LE, Kreidler J, Palm F. A composite polymer/tricalcium phosphate membrane for guided bone regeneration in maxillofacial surgery. *J Biomed Mater Res*. 2001; 58(5): 564-9.
35. Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 2005; 26: 5158–66.
36. Hakimi O, Murphy R, Stachewicz U, Hislop S, Carr AJ. An electrospun polydioxanone patch for the localisation of biological therapies during tendon repair. *Eur Cell Mater* 2012; 24: 344–57; discussion 357.

37. Saska S, Pilatti L, Silva ESS, Nagasawa MA, Câmara D, Lizier N, et al. Polydioxanone-Based membranes for bone regeneration. *Polymers (Basel)*. 2021; 13(11): 1685.
38. Rowland DCL, Aquilina T, Klein A, Hakimi O, Alexis-Mouthuy P, Carr AJ, et al. A comparative evaluation of the effect of polymer chemistry and fiber orientation on mesenchymal stem cell differentiation. *J Biomed Mater Res Part A* 2016; 104A: 2843–53.
39. Sabino MA, González S, Márquez L, Feijoo JL. Study of the hydrolytic degradation of polydioxanone PPDx. *Polym Degrad Stab*. 2000; 69(2): 209–16.
40. Goonoo N, Jeetah R, Bhaw-Luximon A, Jhurry D. Polydioxanone-based biomaterials for tissue engineering and drug/gene delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015; 97: 371-91.

APÊNDICE A

MATERIAIS E MÉTODOS

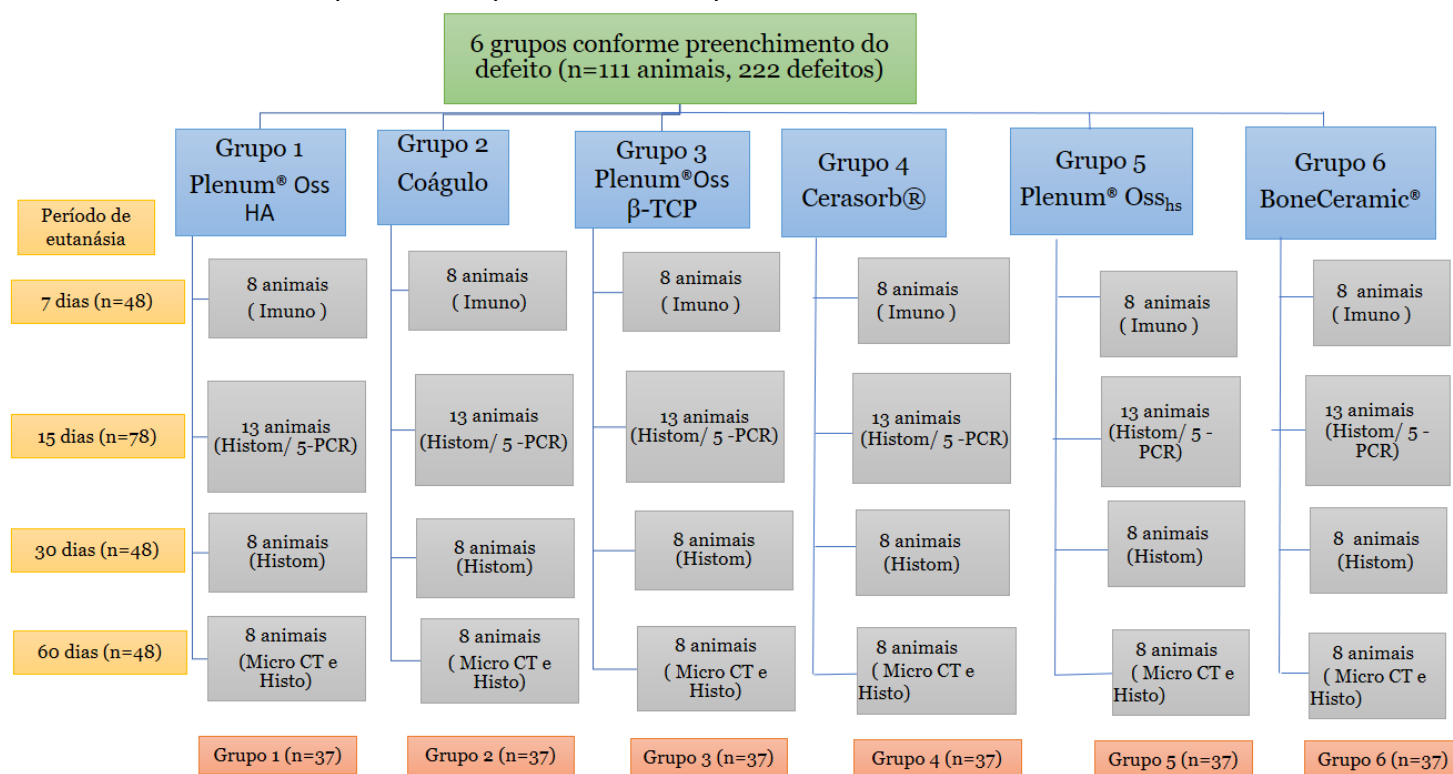
Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, com número de registro 43/2017. Os experimentos foram realizados dentro dos padrões estabelecidos pela norma ISO 10993- “*Biological evaluation for medical devices- Part 6: Tests for local effects after implantation*”. (ANEXO A).

Delineamento do estudo

A amostra consistiu de 185 ratos (*Rattus Norvegicus Holtzman*), adultos, machos, pesando entre 260 e 350 g, com média de 3 meses de vida, fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram mantidos em condições padronizadas, com água e ração *ad libitum* e sob temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos claro/escuro de 12 horas.

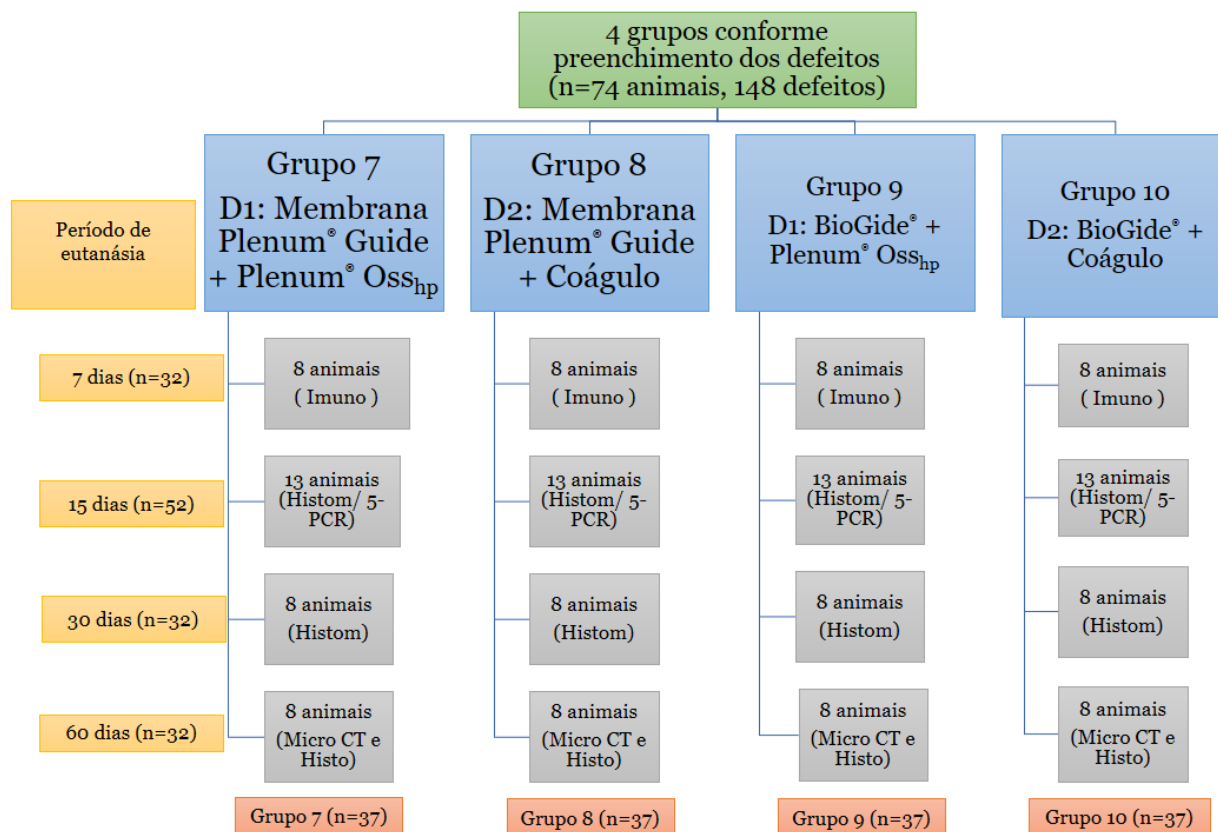
Para atender os protocolos de otimização e reduzindo o número de animais, foram realizados dois defeitos de 5mm de diâmetro na calvária dos animais. Os animais foram divididos aleatoriamente em 10 grupos de tratamentos, sendo 6 grupos relacionados às análises das biocerâmicas e 4 grupos relacionados à regeneração óssea guiada. Os animais foram avaliados quatro períodos de tempos (7, 15, 30 e 60 dias), sendo adicionado ao período de 15 dias, cinco animais para a realização das análises de PCR, como ilustrado no fluxograma da Figura A1 e A2.

Figura A1- Distribuição das análises dos grupos das biocerâmicas, constando a distribuição dos animais quanto aos tipos de análises, períodos de eutanásia e número de amostras.



Fonte: Elaboração própria

Figura A2- Distribuição das análises dos grupos de Regeneração Óssea Guiada, constando a distribuição dos animais quanto aos tipos de análises, períodos de eutanásia e número de amostras.



Fonte: Elaboração própria

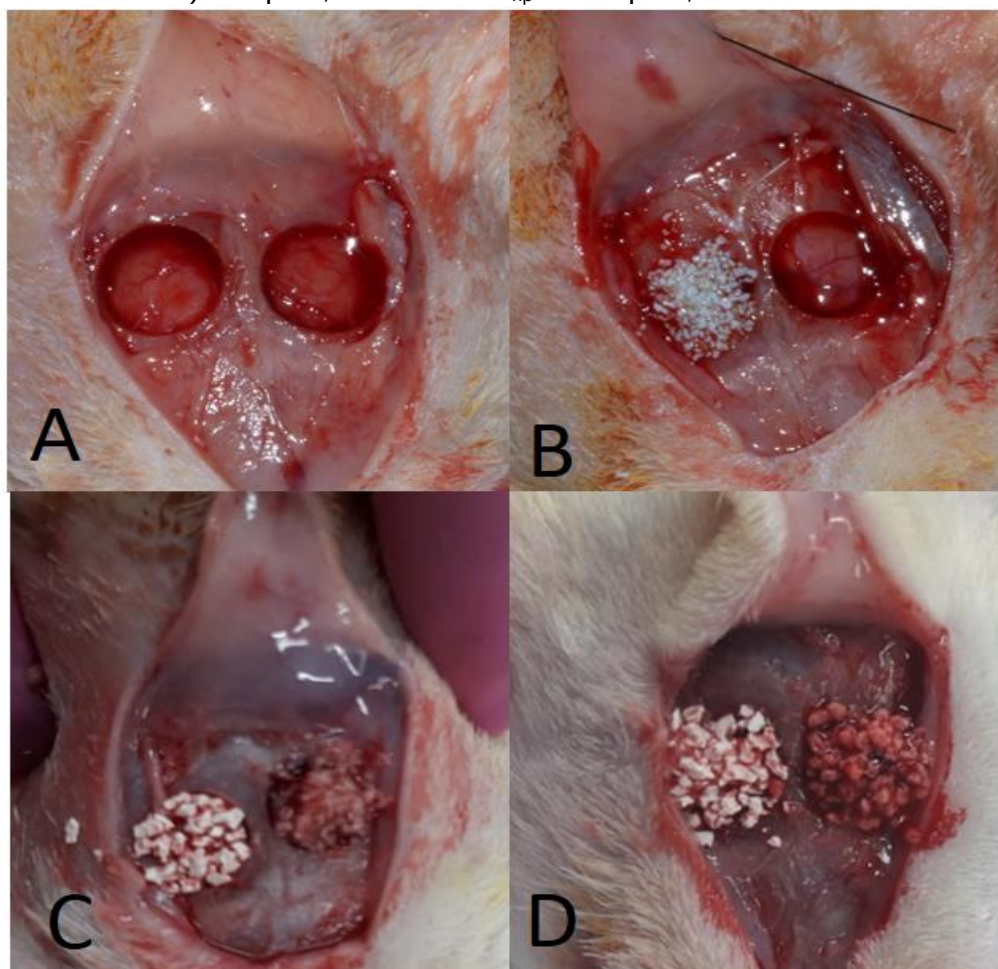
Obtenção das amostras

Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados por meio de administração intramuscular de cloridrato de ketamina 25 mg/kg (Syntec - Santana de Parnaíba, SP) e de cloridrato de xilazina 5 mg/Kg (Syntec - Santana de Parnaíba, SP). Após a anestesia e tricotomia da região parietal, os animais foram acomodados em posição dorsal, e receberam incisão em formato de “V” sobre os ossos parietais, seguido de descolamento e afastamento dos tecidos até a exposição do osso parietal bilateralmente.

Foram realizados dois defeitos ósseos com o auxílio de uma trefina de 5 mm de diâmetro interno (Ref. 103.027, Sistema Neodent, Curitiba, Brasil) sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9% e consistiu na perfuração total do osso parietal mantendo a integridade da dura-máter.

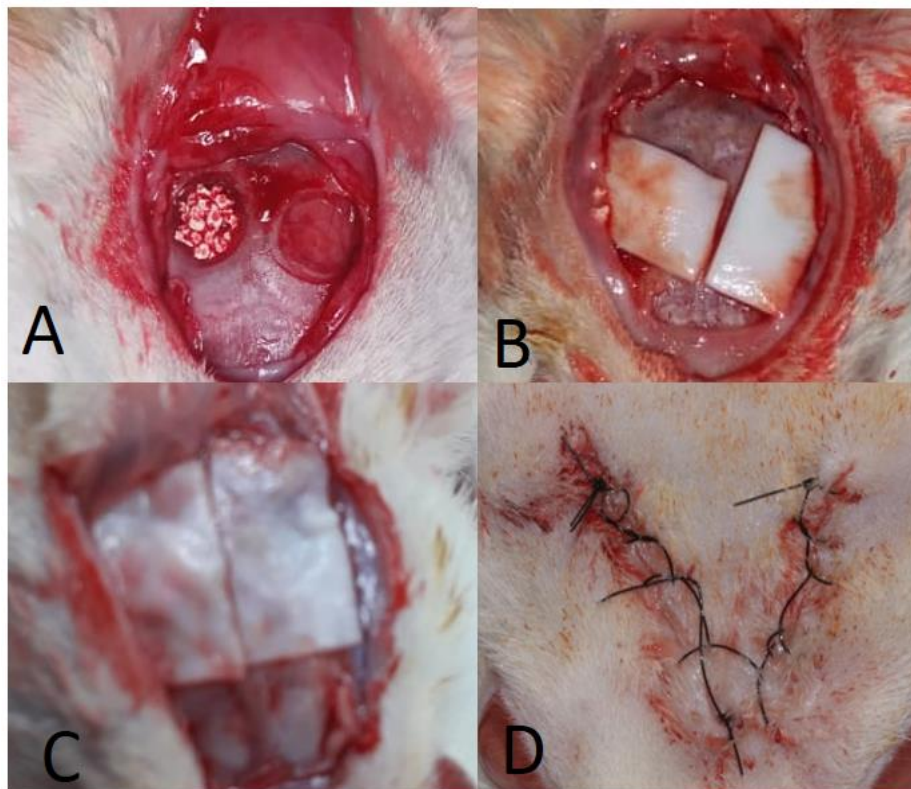
Após o preenchimento dos defeitos, foram realizadas as suturas com mononylon 5-0 (Ethicon®, Johnson & Johnson). Todos os animais receberam em dose única nos pós-operatório imediato, por via intramuscular Dipirona Sódica D 500 (Zoetis, Campinas, Brasil) e pentabiótico para animais de pequeno porte, 1.200.00UI (Zoetis®, Campinas, Brasil) e evoluíram sem sinais de infecções ou complicações pós-operatórias. Figuras A3 e A4.

Figura A3- Confeção e preenchimento dos defeitos críticos em calvária de ratos. Grupos das biocerâmicas. A). Defeitos críticos confeccionados com auxílio de trefina, com 5mm de diâmetro, padronizado para todos os grupos como grupos ímpares, defeito do lado direito e grupos pares, defeito do lado esquerdo. B). Grupo 1 preenchimento com Hidroxiapatita Plenum® Oss HA e Grupo 2 com coágulo sanguíneo. C).: Grupo 3, Plenum® Oss β -TCP e Grupo 4 Cerasorb®. D). Grupo 5, Plenum® Oss_{np}® e Grupo 6, Straumann® BoneCeramic™.



Fonte: Elaboração própria

Figura A4- Confeção e preenchimento dos defeitos críticos em calvária de ratos. Grupos ROG. A). Preenchimento padronizado dos defeitos críticos para todos os grupos da ROG, sendo o defeito do lado direito preenchido com a biocerâmica bifásica Plenum® Oss_{hp} e defeito do lado esquerdo com coágulo, diferindo apenas pela membrana recobrindo os defeitos. B). Grupos 7 e 8 recobertos pela membrana Plenum® Guide. C). Grupos 9 e 10, recobertos por membrana Bio Gide®. D). Aspecto final da sutura contínua festonada realizada em todos os animais.



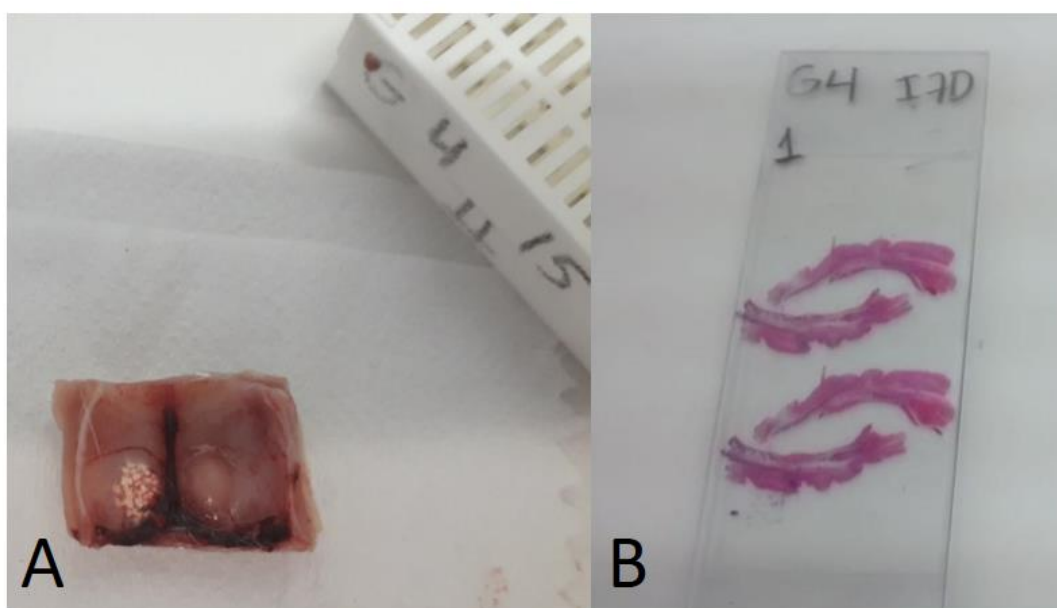
Fonte: Elaboração própria

A eutanásia dos animais ocorreu por meio de superdosagem de anestésico e foram realizadas nos períodos de 07, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. O procedimento de eutanásia foi realizado, por meio de superdosagem de anestesia geral com a administração intramuscular de cloridrato de ketamina 25 mg/kg (Syntec - Santana de Parnaíba, SP) e de cloridrato de xilazina 5 mg/Kg (Syntec - Santana de Parnaíba, SP) e as amostras de calvária foram coletadas e reduzidas preservando perióstio, dura-máter e parte do encéfalo para as devidas análises. As amostras foram removidas por completo e fixadas em solução de paraformaldeído 4%, exceto os animais pertencentes ao grupo do PCR, que tiveram um processamento diferente, descrito a seguir, e na sequência, armazenadas em soluções específicas para preparação para as análises propostas.

Processamento das peças cirúrgicas

As amostras de calvárias foram removidas por completo e fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 48 horas e lavadas posteriormente em água corrente por 48 horas. As amostras que foram avaliadas apenas por meio das análises imunoistoquímica e histometria foram armazenadas em EDTA a 10% trocado 2 vezes por semana, durante 90 dias (períodos de 7 e 15 dias). As peças foram reduzidas e desidratadas em álcool etílico e preservadas em resina pura (LR White hard Grade, London, UK) para inclusão com posterior polimerização das amostras. Para os animais das análises de microtomografia computadorizada (μ CT) após a lavagem, as calvárias foram armazenadas em álcool 70% e após a realização do escaneamento foram armazenadas em EDTA a 10%, seguindo os mesmos passos de processamentos das demais amostras. Figura A5.

Figura A5- Processamento das amostras. A). Redução da calvária para inclusão em resina pura. B). Lâminas histológicas, contendo 2 cortes por lâmina.



Fonte: Elaboração própria

Análise de histometria

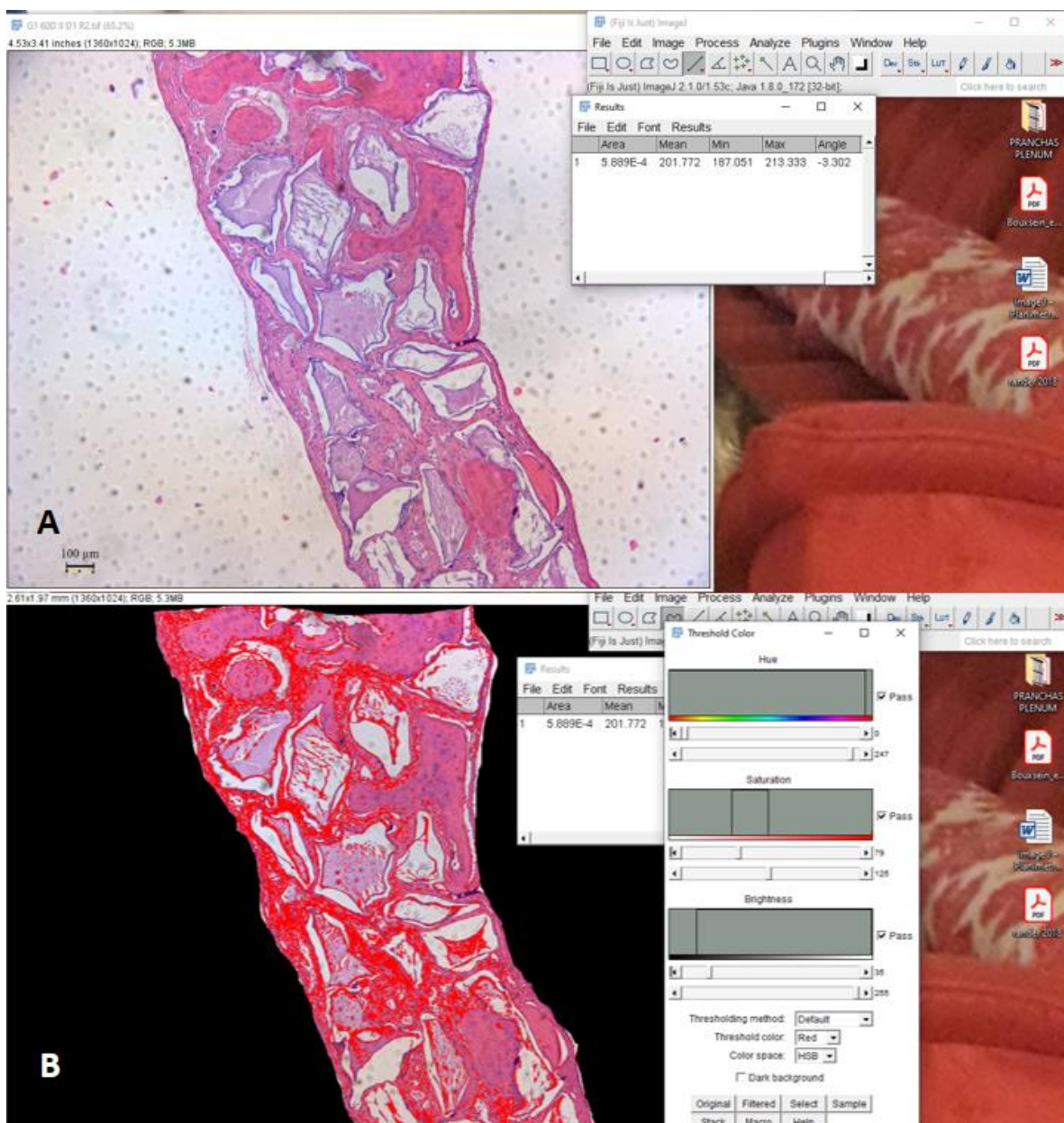
Parte das amostras obtidas de todos os períodos experimentais foram destinadas a análise microscópica, tanto do ponto de vista quantitativo, para mensuração dos tecidos formados junto aos materiais regenerativos implantados, como também do ponto de vista imuno-istoquímico, com o intuito de caracterizar proteínas da matriz óssea que possam estar envolvidas no padrão de respostas promovidas por cada biomaterial introduzido no defeito. Assim, verificada a correta

desmineralização das peças, estas foram utilizadas para avaliação histológica de histometria. Foram obtidos cortes de 6µm de espessura de cada peça, divididos em lâminas com 4 cortes cada, corados por hematoxilina-eosina.

A avaliação histométrica das peças foi realizada utilizando-se um microscópio de luz DIASTAR (Leica Reichert & Jung Products®, Germany), com objetivas para aumento de 5 vezes. As imagens representativas foram enviadas para um microcomputador, utilizando-se de uma câmera fotográfica digital (Leica Microsystems® DFC-300-FX – Alemanha), acoplada ao microscópio de luz comum, e salvas sob a extensão TIF. A determinação dos valores foi realizada empregando-se um software analisador de imagens ImageJ FIJI (Broken Symmetry® Software 1.43.76, USA). Um examinador treinado realizou a análise, tendo os cotos ósseos como referências e delimitando o defeito. A área foi delimitada usando o recurso de “mão livre” no próprio software e as áreas totais da amostra foram estabelecidas como 100%. Em seguida, foram mensuradas a quantidade de tecido ósseo, remanescente de biomaterial e tecido conjuntivo por meio da ferramenta de *threshold* de cores, e os espaços vazios foram subtraídos do cálculo quando presentes (Figuras A6 e A7). A porcentagem de cada componente foi obtida pela média de duplicatas de cada defeito.

Figura A6- Histometria do Grupo1, Plenum® Oss HA, período de 60 dias.

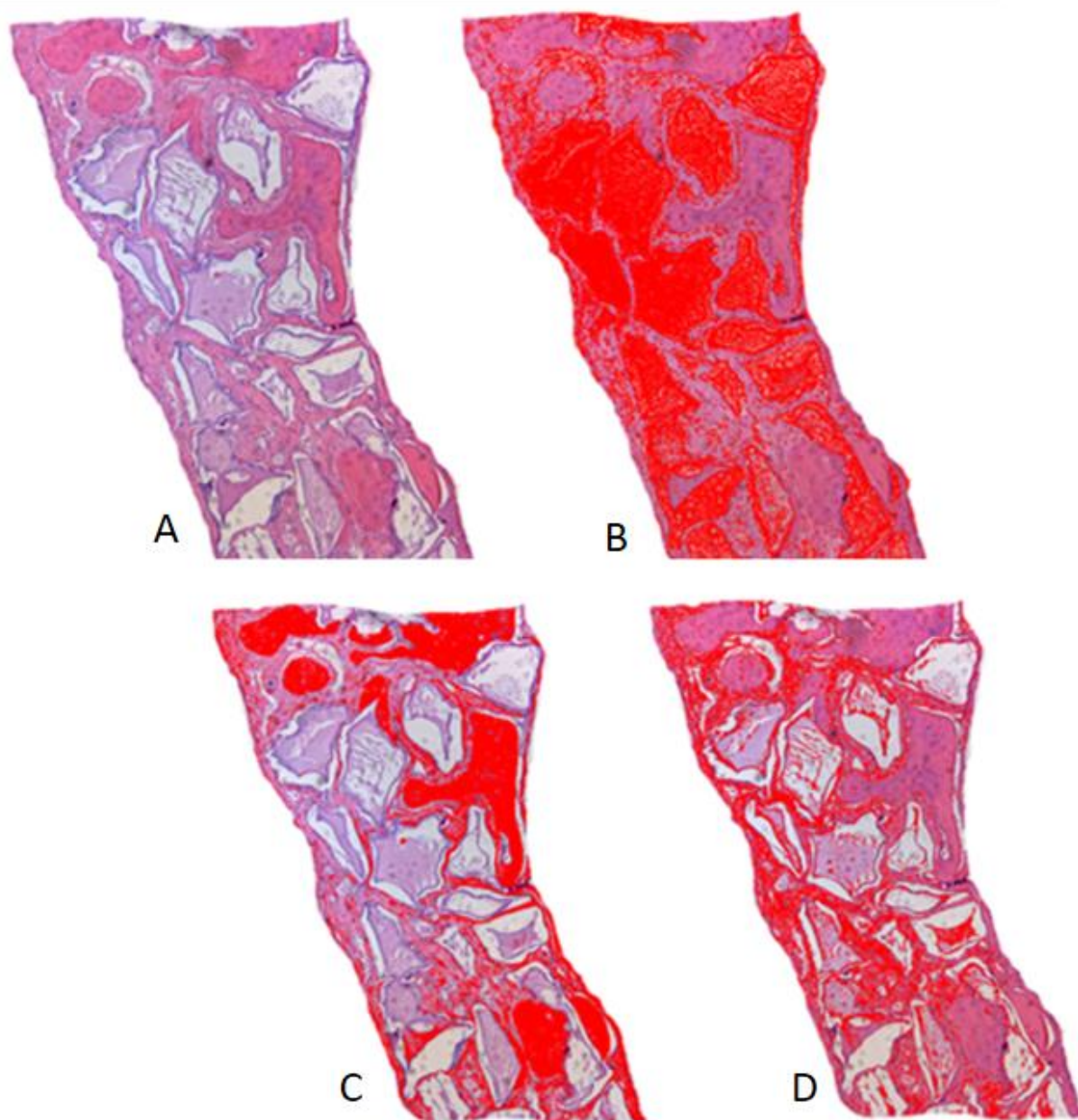
A: Corte histológico tamanho original, ilustrando a calibração e mensuração da área total. B: ilustrando a área do defeito delimitado e mensuração do tecido conjuntivo por Threshold de cores pelo software ImageJ. Fiji.



Fonte: Elaboração própria

Figura A7- Histometria do Grupo Plenum® Oss HA, período de 60 dias, ilustrando as mensurações por Threshold de cores, realizada pelo software ImageJ.

A) imagem histológica original, na coloração de HE, sem filtros. B) Remanescente de biomaterial. C) Tecido ósseo. D) tecido conjuntivo.



Fonte: Elaboração própria

Análise imunohistoquímica

As análises de imunohistoquímica foram realizadas por meio da técnica de detecção pela imunoperoxidase. Após a desparafinização dos cortes histológicos, a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio por 30 min. Em seguida, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) e o bloqueio da biotina endógena através de albumina bovina 1% e leite desnatado.

Os anticorpos primários utilizados foram contra as proteínas OCN, OPN, RUNX2, OPG e RANKL (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA). O controle negativo foi realizado por meio da omissão de anticorpos primários. Ainda, como controle positivo, foi utilizado a cortical hígida do osso parietal livre de defeito, para verificação da efetividade dos anticorpos utilizados. O anticorpo secundário usado foi o anticorpo biotinilado anti-rato (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). A Biotina avidina foi utilizada para amplificar o sinal de imunomarcação e o cromógeno utilizado foi o Diaminobenzidina (Dako, Glostrup, Dinamarca). As amostras foram contra-coradas com solução de Hematoxilina Mayer. As imagens foram obtidas usando uma câmera acoplada ao microscópio de luz (Leica Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Alemanha).

A análise descritiva foi realizada por um único examinador treinado (RO), atribuindo escores para verificar a expressão das proteínas na região dos defeitos ósseos, a saber: (0) sem marcação (0% de células/matriz), (1) leve (<25% de células/matriz), (2) moderado (25-50% de células/matriz) e (3) intenso (>50% de células/matriz).

Análise da expressão gênica.

No período de 15 dias da enxertia dos materiais regenerativos, foram coletados o tecido ósseo, dos defeitos críticos, de 5 animais acrescentados para essa análise da expressão dos genes RUNX2, IBSP e VEGF.

Cada fragmento ósseo foi removido com a utilização de uma trefina de 7mm de diâmetro (Harte®, Ribeirão Preto/SP, Brasil), para contemplar com margem de segurança o defeito de 5mm. A remoção foi realizada sob constante irrigação de uma solução resfriada de tampão fosfato-salino (PBS) e posteriormente acondicionados em criotubos de 2,0ml (Corning®, Nova York, EUA), congelados em nitrogênio líquido

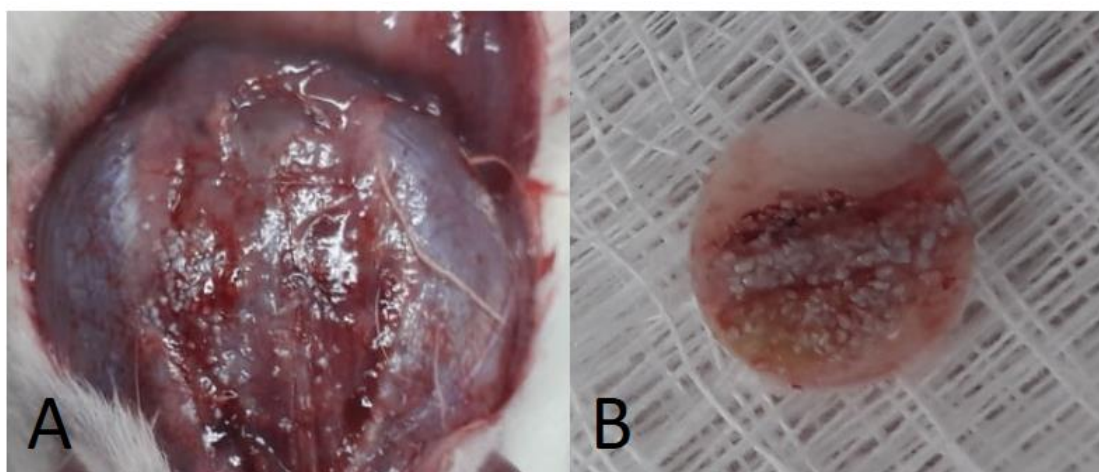
e armazenados em Freezer -80°C (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), para que o RNA total seja isolado com o auxílio do reagente Trizol (Life Technologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A extração do RNA foi realizada através do kit Promega (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Figura A8.

O RNA foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop®2000 (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) e foi confeccionado o cDNA utilizando 1µg de RNA por meio da reação da transcriptase reversa (M-MLV: transcriptase reversa: High capacity (Waltham, Massachusetts, USA). A sequência dos primers foi amplificada e seus produtos foram submetidos a eletroforese com gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo e visualizados utilizando o software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA).

Por fim, a PCR em tempo real foi conduzida com base no sistema StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando o sistema de corantes fluorescentes para detecção SybrGreen (Primer Design Ltd, Southampton, UK) sob as condições cíclicas: 95° durante 10 minutos para a desnaturação primária, e 35 ciclos de 95° por 15 segundos para abertura das fitas e, finalmente, 60° por 60 segundos para anelamento dos primers e extensão dos fragmentos.

Figura A8- Processamento das amostras para análise de PCR.

A). Exposição da região de calvária para visualização da região dos defeitos. B). Fragmento ósseo removido com auxílio de trefina com 7mm, pronto para armazenamento em criotubos com nitrogênio líquido.



Fonte: Elaboração própria

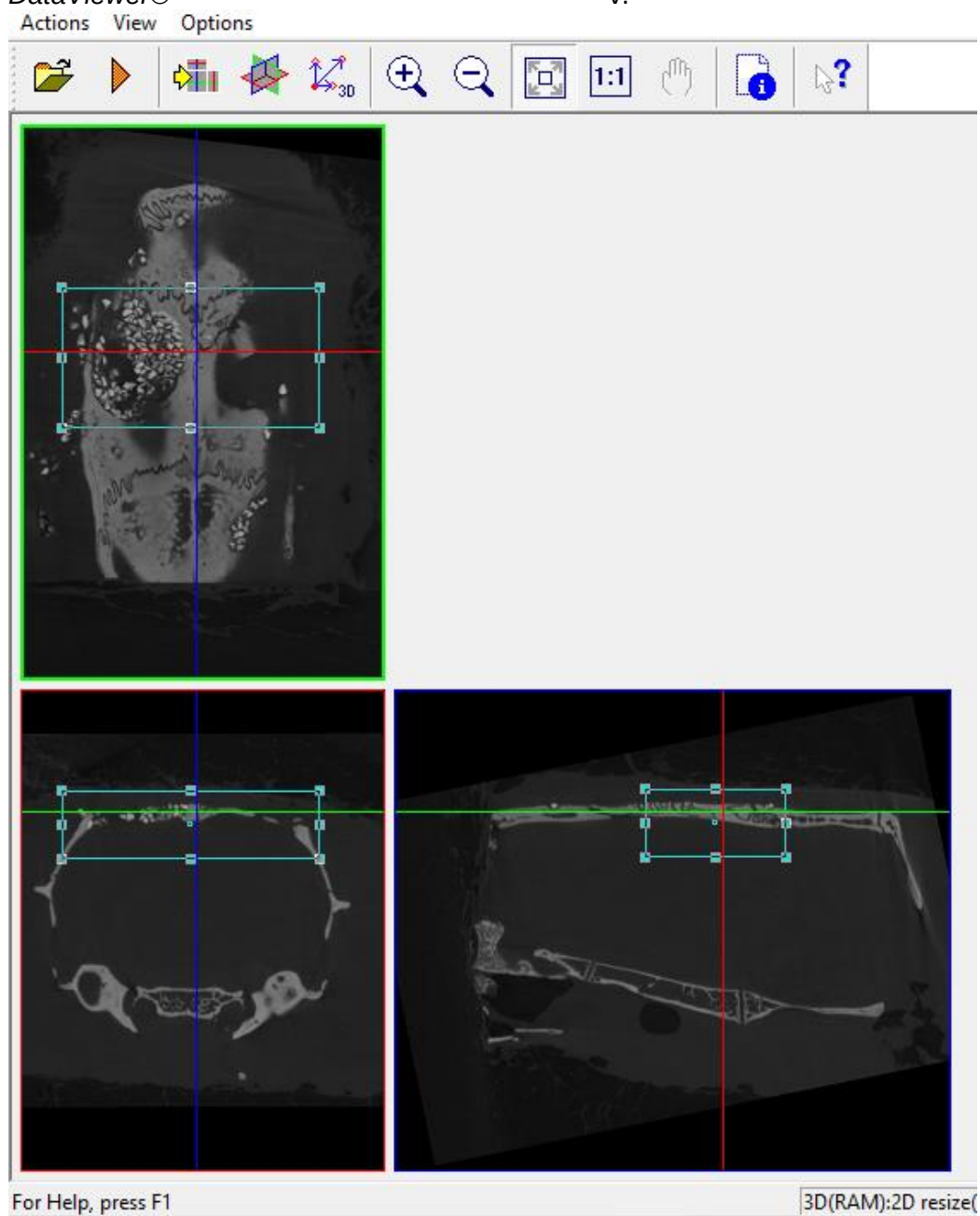
Escaneamento μ CT

No período de 60 dias, após os procedimentos experimentais, as amostras foram coletadas e reduzidas preservando perióstio, dura-máter e partes do encéfalo para a realização do escaneamento. As amostras foram removidas por completo e fixadas em solução de paraformaldeído 4% (Êxodo Científica, Sumaré, Brasil) tamponado por 48 horas, lavadas em água corrente por 48 horas, armazenadas em álcool 70% (Jalles Machado, Goiás, Brasil) e foram submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada (μ CT).

Para a aquisição das imagens foram adotadas uma resolução espacial 12 μ m; as imagens foram adquiridas com equipamento Phoenix V |tome| x M Microfocus Scanner (General Electric Company®, Wunstorf, Germany) com ajuste de voltagem de 80 kV.

Após as aquisições das imagens, os planos axial, coronal e sagital foram alinhados para identificar visualmente todas as regiões de interesse. Os volumes de interesse, (VOIs) foram adquiridos por meio das reconstruções das imagens bidimensionais (2D) e as reconstruções das imagens volumétricas 3D foram obtidas com a utilização do software SkyScan, DataViewer® v. 1.4.1. Figura A9.

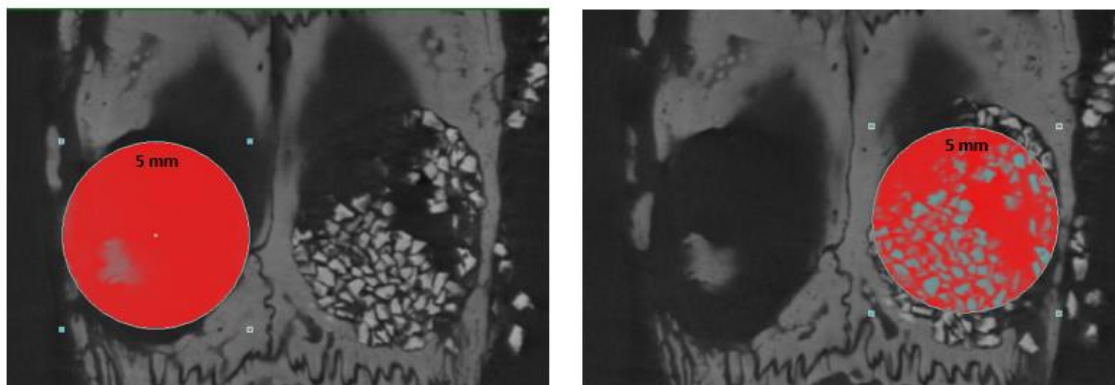
Figura A9- Reconstrução bidimensional (2D). Projeção para imagens volumétricas 3D, *DataViewer®* v. 1.4.1.



Fonte: Elaboração própria

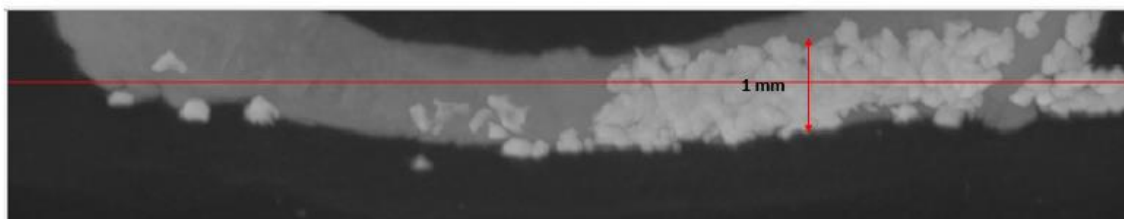
No CTAnalyser® (SkyScan v. 1.11.8.0), uma circunferência de 5.0mm, do mesmo diâmetro da trefina utilizada no procedimento cirúrgico, foi posicionada no centro das áreas dos defeitos (Figura A10) e uma espessura de 1.0mm (Figura A11) foi considerada para análise.

Figura A10- Grupo 7 Plenum® Guide®+ Plenum® Oss_{hp}®, no lado direito do defeito e: Plenum® Guide®+ Coágulo, lado esquerdo do defeito, VOI- Plano Axial.



Fonte: Elaboração própria

Figura A11- Grupo 7 Plenum® Guide®+ Plenum® Oss_{hp}®, no lado direito do defeito e: Plenum® Guide®+ Coágulo, lado esquerdo do defeito, VOI- Plano coronal.



Fonte: Elaboração própria

Em seguida, foi adotado um limiar de escala de cinza (*threshold*) de 105 (máximo) e 75 (mínimo) para a avaliação do tecido ósseo e de 255 (máximo) e 105 (mínimo) para a avaliação dos materiais regenerativos. Os valores dos parâmetros para os materiais regenerativos foram subtraídos dos valores obtidos para o tecido ósseo, para separar os volumes dos materiais regenerativos remanescentes do tecido ósseo neo-formado.

Foram utilizados os seguintes parâmetros para a análise dimensional da microarquitetura do osso trabecular, baseado na nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone Mineral Research (2010)*..:

- *Percent bone volume (BV/TV)*.: porcentagem de tecido ósseo em relação a área total do tecido avaliado em %
- *Trabecular number (TbN)*.: Número médio de trabéculas por unidade de comprimento (mm).
- *Trabecular separation (TbSp)*.: Distância média entre as trabéculas em mm.
- *Trabecular thickness (TbTh)*.: Espessura média das trabéculas em mm
- *Connectivity density (ConnDn)*: Densidade de conectividade entre as trabéculas em mm³.

Os parâmetros microtomográficos analisados tiveram como objetivo a avaliação da arquitetura e volume tanto do tecido mineralizado quanto do biomaterial remanescente, sendo avaliados separadamente, considerando um valor de *threshold* para análise de tecido mineralizado e outro *threshold* para o remanescente de materiais regenerativos, usando os mesmos parâmetros microtomográficos para a análise de tecido mineralizado. Não foram utilizados parâmetros para osso cortical, visto que o objetivo foi a avaliação de tecido mineralizado medular. As análises estatísticas foram realizadas de acordo com as comparações realizadas pelos artigos.

**ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO
USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA**



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

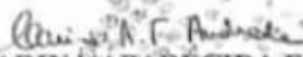


FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRÍTICOS PREENCHIDOS COM DIFERENTES BIOMATERIAIS CERÂMICOS"***, registrada com o nº 43/2017, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Valfrido Antônio Pereira Filho** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 23/02/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato – Rattus Novergicus Holtzman
Nº de animais	185
Peso/Idade	350-500 g – 3 a 4 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP


Prof. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
 Coordenadora da CEUA

**NÃO autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de até 02 anos após a
data de defesa**

Direitos de publicação reservado ao autor

Araraquara, 04 de março de 2022.

Lilian Caldas Quirino de Almeida