

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
NÍVEL DOUTORADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA/  
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAIS

LUCIENNE MIRANDA ULBRICH

AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM USO DE COMPÓSITO DE POLI (BUTILENO  
ADIPATO CO-TEREFTALATO) – PBAT - ASSOCIADO A BIOVIDRO E NÍÓBIO

Porto Alegre  
2022

LUCIENNE MIRANDA ULBRICH

AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM USO DE COMPÓSITO DE POLI (BUTILENO  
ADIPATO CO-TEREFTALATO) – PBAT - ASSOCIADO A BIOVIDRO E NIÓBIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica/Cirurgia e Traumatologia Bucodentofacial.

Orientadora: Profa. Dra. Deise Ponzoni

Porto Alegre  
2022

## CIP - Catalogação na Publicação

Ulbrich, Lucienne Miranda

Avaliação do reparo ósseo com uso de compósito de poli(butileno adipato co-tereftalato) - PBAT - associado a biovidro e nióbio / Lucienne Miranda Ulbrich. -- 2022.

35 f.

Orientador: Deise Ponzoni.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. tecido ósseo. 2. engenharia tecidual. 3. experimentação animal. 4. enxertos ósseos. 5. materiais biocompatíveis. I. Ponzoni, Deise, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LUCIENNE MIRANDA ULBRICH

AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM USO DE COMPÓSITO DE POLI (BUTILENO ADIPATO CO-TEREFTALATO) – PBAT - ASSOCIADO A BIOVIDRO E NIÓBIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica/Cirurgia e Traumatologia Bucodentofacial.

Porto Alegre, 22 de fevereiro de 2022.

Profa. Dra. Deise Ponzoni  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Márcia Gaiger de Oliveira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Stéfani Becker Rodrigues  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Melissa Rodrigues de Araújo  
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Carla Castiglia Gonzaga  
Universidade Positivo – suplente externo

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, meu melhor amigo.

Ao PPGODO, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela oportunidade de fazer meu doutorado na UFRGS.

Ao Departamento de Cirurgia e Ortopedia e ao Laboratório de Materiais Dentários da UFRGS, por acreditarem na pesquisa e confiarem a mim o teste de um novo biomaterial.

À Profa. Dra. Deise Ponzoni, pela orientação e amizade em todos os momentos, desde o mestrado até a conclusão do doutorado.

À Prof. Dra. Edela Puricelli, por me introduzir na área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilo-faciais e na pesquisa acadêmica séria, honesta e transparente.

Aos professores da banca examinadora, pelas contribuições a esta pesquisa.

À Gabriela Balbinot, pela fabricação dos protótipos.

Aos colegas de doutorado, pela ajuda nas disciplinas e nos trabalhos.

À Universidade Positivo, pelo apoio durante os anos de doutorado.

À Denise Piotto Leonardi, amiga, professora e profissional de valor inestimável que me ajudou sempre a ver o lado positivo da vida.

Ao Dr. Luis Roberto Regattieri, pelos ensinamentos desde o início da minha carreira.

Aos funcionários do biotério da Universidade Positivo, pela ajuda inestimável e pelo carinho e cuidado com os animais.

Aos alunos e estagiários, pela ajuda na parte experimental.

À minha família Ionne, Paulo, Fernando, Raquel, Bianca, Laura e Ivan pelo apoio, traduzido em muitas formas, nesses longos anos de estudo para o doutorado.

Ao médico veterinário Dr. Paulo Miranda, por me ajudar na parte experimental e nas instruções do manejo correto e ético de animais.

Ao Dr. Lionel Leitzke e Enfa. Ivone Leitzke, por me dar a mão sempre, seja de perto ou de longe, pela hospitalidade, pelo ombro-amigo, pelos abraços e pela motivação em cada etapa desta longa jornada, enfim, pela amizade verdadeira e eterna.

Aos amigos que passaram por esta fase, de perto e de longe, por pouco ou muito tempo, pela amizade que se traduziu em contribuição para a conclusão deste trabalho.

Instruir-te ei e te ensinarei o caminho que deves seguir,  
e sob as Minhas vistas, te darei conselho.

Davi

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** biomateriais têm sido desenvolvidos para uso como substitutos ósseos para a recuperação funcional e estética de perdas de estrutura óssea por trauma ou patologias. Os compósitos à base de polímeros biodegradáveis têm se mostrado uma opção terapêutica promissora. **OBJETIVO:** avaliar o reparo ósseo, *in vivo*, de um compósito de poli (butileto adipato co-tereftalato) (PBAT) associado a biovidro e nióbio em fêmures de ratos (PBAT/BAGNb). **METODOLOGIA:** cento e quarenta ratos foram divididos em 4 grupos, sendo (1) controle negativo sem preenchimento; (2) controle positivo com osso autógeno; (3) matriz óssea bovina desmineralizada (MOBD); e, (4) compósito de PBAT/BAGNb. No fêmur de cada rato foi criado um defeito cirúrgico crítico de 2mm de diâmetro por 2mm de profundidade. Cada grupo foi preenchido com o respectivo enxerto ou substituto ósseo, com exceção do grupo controle negativo. O compósito foi fabricado como arcabouço tridimensional nas dimensões do defeito. Os tempos experimentais foram de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Os fêmures foram submetidos às análises qualitativa e histomorfométrica. Os dados qualitativos foram descritos e os dados quantitativos foram tabulados e submetidos à análise estatística. **RESULTADOS:** na análise qualitativa, o compósito formou osso em um padrão de osteogênese ao redor do compósito; os grupos autógeno e MOBD formaram osso como descrito em estudos prévios; no grupo controle não ocorreu formação de osso no interior do defeito. Os dados quantitativos mostraram neoformação óssea em todos os grupos, com maior área de neoformação para o grupo MOBD ( $39,2 \pm 10,29\%$ ), seguida pelo enxerto autógeno ( $36,5 \pm 13,05\%$ ), pelo grupo controle ( $24,9 \pm 6,67\%$ ), e pelo grupo PBAT/BAGNb ( $12,3 \pm 5,63\%$ ). Houve diferença estatisticamente significante entre todos os grupos, com exceção dos grupos autógeno e MOBD, quando analisados entre si. **CONCLUSÃO:** o compósito de PBAT/BAGNb formou osso em um padrão de neoformação ao redor do arcabouço e dentro dos poros, porém, em pequena quantidade de área de neoformação óssea ( $12,3 \pm 5,63\%$ ) em comparação aos demais grupos estudados.

Palavras-chave: tecido ósseo; engenharia tecidual; experimentação animal; enxertos ósseos; materiais biocompatíveis.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** biomaterials have been developed to enhance functional and aesthetical repair due to bone loss from trauma or pathologies. Composites based on biodegradable polymers have been a promising therapeutic option. **OBJECTIVE:** to assess the bone repair, *in vivo*, with a composite of poly (butylene adipate co-terephthalate) and niobium-doped bioglasses (PBAT/BAGNb), in rat femurs. **METHODOLOGY:** one hundred and forty rats were divided into 4 groups: (1) sham control without filling; (2) positive control with autogenous bone graft; (3) demineralized bovine bone matrix (MOBD); and, (4) PBAT/BAGNb composite. A surgical defect of 2mm diameter per 2 mm depth was surgically created on each femur. Each group received a bone graft or biomaterial; the sham group did not receive filling. The composite was designed and printed as a tridimensional scaffold within the shape of the surgical defect. The experimental periods were 15, 30 and 60 post-operative days. The femurs were submitted to qualitative and histomorphometric analysis. The qualitative data were described. The quantitative data were submitted to statistical analysis. **RESULTS:** the qualitative analysis showed an osteogenic pattern around the scaffold as well as inside its pores; the autogenous and MOBD groups showed the same neoformation as described in previous studies; in the control groups there were no complete bone formation. The quantitative data showed that bone neoformation occurred in all the groups, with the larger neoformation area for MOBD ( $39,2 \pm 10,29\%$ ), followed by autogenous bone graft ( $36,5 \pm 13,05\%$ ), control group ( $24,9 \pm 6,67\%$ ), and, PBAT/BAGNb ( $12,3 \pm 5,63\%$ ). There was statistically significant difference among all groups, except for groups autogenous and MOBD. **CONCLUSION:** PBAT/BAGNb composite enhanced the bone formation in and around the scaffold, however, in small amount of newly formed bone area ( $12,3 \pm 5,63\%$ ) compared to the other groups.

Keywords: bone and bones; tissue engineering; animal experimentation; bone graft; biocompatible materials.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>09</b>
1.1	TECIDO ÓSSEO .....	09
1.2	ENGENHARIA TECIDUAL .....	10
1.3	ENXERTOS E SUBSTITUTOS ÓSSEOS .....	13
1.4	BIOVIDROS .....	16
1.5	PBAT .....	17
1.6	MATRIZ ÓSSEA BOVINA DESMINERALIZADA .....	18
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>32</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A tese de doutorado apresentada avalia um novo substituto ósseo em modelo animal.

O compósito de PBAT, biovidro e nióbio (PBAT/BAGNb) foi desenvolvido no Laboratório de Materiais Dentários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). É composto por poli(butileno) adipato co-tereftalato (PBAT), um polímero inerte; biovidro, um material osteocondutor, e nióbio (Nb), um íon com potencial de melhorar a neoformação óssea e a resistência mecânica. A tese foi escrita no formato de artigo científico.

### 1.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido conjuntivo, sendo sua característica mais marcante a presença de matriz extracelular calcificada. Ela se divide em porções orgânica e inorgânica. Sua composição é de 30% de matriz, 60% de minerais e 10% de água. Na matriz estão as proteínas colagenosas e não-colagenosas. As células estão distribuídas pelo tecido, dependendo da sua função como osteoblasto, osteócito ou osteoclasto (1,2,3). Sua parte mineral é composta por fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$ ) e hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ), com poros interconectados e estrutura cristalina, o que permite a troca de íons com a matriz óssea (2,4).

O tecido ósseo tem a capacidade de fazer reparo morfológico e funcional depois de sofrer perda de estrutura, seja por fratura, trauma ou patologias. É o único tecido conjuntivo que repara sem a formação de cicatriz fibrosa porque os processos moleculares, celulares e sua estrutura físico-química são semelhantes aos processos do desenvolvimento embrionário esquelético. Após o reparo, o tecido mantém suas características morfológicas e mecânicas. Os dois processos pelos quais o reparo é realizado são o endocondral e o intramembranoso. Eles ocorrem em duas fases: neoformação mediada por osteoblastos e reabsorção mediada por osteoclastos. Para que ocorram, é necessário ter uma região vascularizada(1,5,6,7).

Em casos de defeitos não-críticos, tem capacidade de reparo sem a formação de cicatriz fibrosa. Porém, em defeitos críticos, ou seja, aqueles que não reparam sem enxertia ou substituição de tecido, necessitam de preenchimento. Um defeito crítico sem preenchimento não apresenta o reparo ósseo total da região e a ossificação pode se interpor a tecido fibroso(5,8,9,10). No processo de reparo, a matriz e seus componentes participam da sinalização para o crescimento de vasos sanguíneos e a migração de células osteoprogenitoras para o local a ser reparado. A matriz é o ambiente favorável para o crescimento, migração de osteoblastos e produção de tecido mineralizado(2,4).

Paralelamente aos conceitos sobre a fisiologia do tecido ósseo é importante descrever a vascularização tecidual e os processos referentes a ela, pois a vascularização é fator primordial para que ocorra o reparo ósseo. O termo angiogênese é usado para se referir ao crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes das proximidades do local a ser revascularizado(5,6,11,12,13).

Os vasos sanguíneos são essenciais para a formação e crescimento de osso, bem como para a formação e de cartilagem, e desenvolvem um papel importante no reparo de defeitos ósseos. Como os vasos penetram nos arcabouços e transportam oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento, hormônios, citocinas, células-tronco, células precursoras de osteoblastos/osteoclastos para os tecidos locais, íons cálcio e fosfato para a mineralização, o aumento da formação de vasos aumenta proporcionalmente a formação de tecido ósseo. A vascularização também remove os produtos do metabolismo e media as interações entre células ósseas e células vasculares. Para isso é necessário que ocorra a ativação de mecanismos complexos entre os processos de angiogênese e osteogênese(5,6,12,13,14,15). As células ósseas do tecido adjacente irão penetrar o defeito ósseo, previamente preenchido por coágulo. A formação de osso depende da regeneração/ neoformação da rede vascular tridimensional proveniente da vascularização do tecido hospedeiro(16).

A vascularização começa a ser formada em um tecido ou órgão quando ele aumenta de tamanho além do qual pode ser feita a troca de oxigênio, nutrientes e dejetos metabólicos por difusão. A partir deste momento, surge a angiogênese, que é a formação de vasos sanguíneos a partir dos vasos já existentes. Em resumo, o local de uma fratura fica com hipóxia, pela ruptura dos vasos e da formação de um hematoma. Esta condição gera sinalização para fatores de crescimento pró-angiogênicos, que fazem o início da formação dos vasos no local. Ou seja, o início ocorre com as células endoteliais que, estimuladas pelos fatores de crescimento do endotélio vascular, formam os brotos e, na sequência, os ramos dos novos vasos sanguíneos. Com a anastomose dos ramos existentes, formam-se novos ramos. A fase final é a maturação das células endoteliais, deposição de matriz extracelular, aumento da formação de junções celulares e a remodelação dos ramos vasculares para atingir a rigidez que o fluxo sanguíneo local necessita. Paralelo à esta formação, em cada vaso formado são transportadas as células inflamatórias para o reparo da área do defeito ósseo. Na sequência, formam-se os calos ósseos mole e duro, durante os quais, a nova vascularização os nutre de oxigênio, nutrientes e íons que serão usados no processo de mineralização óssea(5,6,11).

## 1.2 ENGENHARIA TECIDUAL

Baseada na anatomia e fisiologia do tecido ósseo, a engenharia tecidual é um campo de estudo multidisciplinar que tem por objetivo o reparo do tecido lesado. Aplica os conhecimentos das áreas de engenharia e de saúde para reparar tecidos que, de outra forma, não seriam substituídos. Para isso é importante o entendimento de anatomia e fisiologia de cada órgão ou tecido, com vistas ao desenvolvimento de substitutos que restaurem, mantenham ou melhorem as respectivas funções(7,8,17). O tecido ósseo, com suas células e matriz, responde à estímulos biológicos, físicos, químicos e mecânicos. Por isso responde a enxertos e substitutos ósseos, bem como a substâncias e íons liberados por eles. A resposta do tecido é definida pelas propriedades de cada material usado como substituto(18,19).

Atualmente, o melhor conceito de substituição de tecido mineralizado é com arcabouços tridimensionais. Estes simulam a anatomia óssea, interagem com o osso do hospedeiro, protegem o coágulo, impedem a invaginação de tecidos circundantes, e favorecem a migração, invaginação, adesão, proliferação e diferenciação de células e vasos sanguíneos, criando um ambiente propício para a osteogênese. Também, funcionam temporariamente como mantenedor do espaço do defeito ósseo, bem como suporte para as cargas biomecânicas, pois são reabsorvidos gradativamente à medida que o novo osso se forma. Os arcabouços podem ser osteoindutores e/ou osteocondutores para promover formação de novo osso em quantidade e qualidade, bem como favorecer a adesão entre o substituto e o tecido remanescente(2,10,15,17,20,21,22,23,24,25,26).

Arcabouços são delineados para uso em defeitos ósseos bem vascularizados com boa cobertura de tecidos moles. As características associadas às propriedades mecânicas e às funções celulares (crescimento, colonização, migração, diferenciação, produção de matriz) são porosidade média, tamanho médio de poros e espessura média de trabéculas(4,17,19,27).

Suas características que interferem no reparo ósseo podem ser divididas em: material de base, arquitetura 3D, porosidade, tratamento de superfície, propriedades mecânicas, ambiente inicial (pH, osmolaridade), ambiente tardio (degradação). A utilização destes substitutos traz como vantagens a reprodutibilidade, menor custo de fabricação e a possibilidade de ser produzido para defeitos ósseos específicos, com as características escolhidas pelo cirurgião. Pode ser usado como carreador de substâncias e células osteoindutoras, bem como de medicamentos. Para engenharia tecidual: abertura de poros maior que 50% e largura de poro maior que 100 $\mu$ m(14,24).

Para que se proponha um novo substituto ósseo é importante entender os princípios envolvidos na formação de novo osso e na manutenção do tecido já formado. Os conceitos necessários para este entendimento são explicados a seguir.

Osteogênese é a formação de novo osso. Ocorre, como padrão-ouro, em enxertos autógenos que funcionam como um arcabouço e são fontes de células osteoprogenitoras e proteínas ósseas(1,3,4,28). Muitos substitutos ósseos não as possuem e, para ter um resultado semelhante de osteogênese, podem ser associados a células osteoprogenitoras, osteoblastos, proteínas morfogenéticas ósseas, fatores de crescimento, materiais bioativos e matriz óssea desmineralizada. O conceito de osteogênese, portanto, inclui a ideia de que os substitutos, por serem biocompatíveis e osteocondutores, podem possuir células ou proteínas que estimulem o processo de formação de osso, tornando-os osteoindutores e, por conceito, semelhantes ao osso autógeno(4,20).

Osteoindução é um mecanismo de reparo ósseo, no qual a formação de novo tecido é induzida por processos de sinalização do colágeno, proteínas morfogenéticas ósseas e fatores de crescimento. Este processo tem a capacidade de estimular as células mesenquimais ou células-tronco a se diferenciarem em células osteoprogenitoras, seguidas da sua migração e proliferação no local da lesão(1,3,29). Como a matriz óssea possui intrinsecamente estas proteínas e fatores de crescimento, enxertos autógenos e alógenos possuem esta capacidade, ou seja, ocorre a estimulação das células mesenquimais perivasculares para que desagreguem do tecido adjacente, migrem para a área que necessita reparo, reagreguem, proliferem e se diferenciem em cartilagem e osso(3,4,19,28,31).

Osteocondução pode ser definida como a capacidade de crescimento das células ósseas em contato com uma superfície óssea ou com um arcabouço que funcione como matriz óssea e permita a entrada de células ósseas e a deposição de novo osso. O enxerto ou o substituto ósseo pode ser este arcabouço. Quando a função de arcabouço está completa, este é reabsorvido e novo osso é depositado no local. A osteocondução pode, também, ser considerada como a resposta dos osteoblastos a um biomaterial. Ocorre em enxertos autógenos, alógenos e em substitutos ósseos xenógenos. Os substitutos sintéticos podem apresentar esta propriedade, dependendo da sua composição(1,4,28,30,32).

Um conceito importante é que o reparo ósseo precisa da combinação de osteoindução e osteocondução para formar um novo osso(3,4,19,28,30,31,32).

Osteointegração é a capacidade do enxerto ou do substituto ósseo de se unir ao osso circundante(4).

Bioatividade é a interação entre o osso do hospedeiro e o enxerto ou substituto ósseo. Está relacionada ao tipo de enxerto, bem como à composição do substituto ósseo e à sua estrutura de poros(4,21).

Biocompatibilidade é a característica de não provocar reação inflamatória anormal ou resposta imunológica, bem como não ser carcinogênico(9).

Osteogenicidade é a imunogenicidade óssea, ou seja, a capacidade de indução de uma resposta imune por parte do organismo como, por exemplo, a formação de anticorpos(4,9).

Osteotransdutividade é a formação de novo osso na interface osso/enxerto ou osso/substituto ósseo. Ocorre simultaneamente à reabsorção do substituto ósseo pelo sistema imunológico, particularmente pelas células responsáveis pela fagocitose(1).

Além das propriedades do tecido ósseo que devem ser reproduzidas nos substitutos, existem as propriedades ideais de um biomaterial. São elas: biocompatibilidade; facilidade de manipulação transoperatória; propriedades mecânicas, térmicas, químicas e físicas semelhantes ao osso em curto e longo prazos; disponibilidade do material; porosidade; possibilidades de esterilização e armazenamento a longo prazo; tempo de reabsorção/degradação do material e sua transformação em hidroxiapatita, em tempo semelhante ao da formação do novo osso; e, custo-benefício de fabricação(4,5,7,8,9,21,24,33,34).

Em relação às propriedades mecânicas, a substituição de ossos que recebem cargas, principalmente as cargas mastigatórias, deve ser realizada por um substituto que tenha propriedades mecânicas semelhantes ao osso cortical e/ou medular, dependendo da região a ser reabilitada(33). Os arcabouços com a microestrutura em três dimensões apresentam a vantagem de permitir o crescimento de novo osso enquanto suporta as cargas fisiológicas do osso a ser substituído(7,21,24,33,34).

Sobre as propriedades físico-químicas, estas influenciam todo o processo de neoformação óssea, por exemplo, as reações celulares, a formação tecidual e o padrão de degradação do material. Em relação à degradação, os materiais podem ser bioinertes ou biodegradáveis. Os bioinertes são materiais inertes que permanecerão dentro do corpo humano para sempre ou até a sua retirada cirúrgica, se necessário. Os biodegradáveis não necessitam de uma segunda cirurgia para sua remoção, pois serão degradados e substituídos por osso neoformado. A taxa de degradação deles é dependente das características físico-químicas. A degradação do material, *in vivo*, ocorrerá durante e depois do período de reparo(2,15,28).

### 1.3 ENXERTOS E SUBSTITUTOS ÓSSEOS

O enxerto autógeno é considerado o padrão-ouro da reabilitação. Apresenta as características necessárias para a osteogênese, que são: (1) osteoindução; (2) osteocondução; (3) osteogenicidade; (4) alta celularidade; (5) imunologicamente inerte(2,20,24,25,35).

O enxerto autógeno pode ser retirado do sítio doador como osso cortical, medular ou córtico-medular, proporcionando variadas possibilidades de reabilitação, em diferentes locais, com diferentes cargas funcionais e em diferentes apresentações (blocos, granulados, pós) (4,19,24,28).

Porém, é consenso entre os autores que o enxerto autógeno apresenta desvantagens: necessidade de um segundo sítio operatório, maior morbidade cirúrgica, formação de cicatriz, risco maior de hemorragias e infecções, quantidade limitada de osso, limitações anatômicas e cirúrgicas, tendência à reabsorção, pouca resistência mecânica ao ser enxertado e maior tempo de espera até a osteointegração/reabilitação funcional(2,4,7,19,20,24,25,26).

Como segunda opção, dentro dos enxertos da mesma espécie, a literatura apresenta os enxertos alógenos, que são derivados de peças cadavéricas de outros seres humanos e estão disponíveis nos mesmos tipos e apresentações dos enxertos autógenos. Como é da mesma espécie do receptor, o enxerto alógeno pode ser usado como um arcabouço osteogênico, osteoindutivo e osteocondutivo, com poros para a invaginação de vasos sanguíneos e, conseqüentemente, formação de novo osso, com boa qualidade de osteointegração. Apresenta as vantagens de ser de fácil obtenção e não necessitar de um segundo sítio cirúrgico como área doadora. Entretanto, o preparo destas peças pode diminuir consideravelmente as capacidades indutivas e condutivas, bem como a resistência mecânica. Outras desvantagens podem ser citadas: risco de transmissão de doenças bacterianas, virais, alterações na resposta imunológica do receptor, transferência de células malignas, atraso na vascularização e tendência à reabsorção. A esterilização das peças é uma segurança, porém, diminui, consideravelmente as propriedades do osso(4,19,24,28).

Um tipo de enxerto alógeno é a matriz óssea desmineralizada, ou seja, osso que foi particulado e descalcificado, perdendo sua parte mineral. O material restante mantém a estrutura original da matriz extracelular, com as fibras de colágeno e as proteínas, tornando-se um material osteoindutivo e osteocondutivo. Pode ser usada em cavidades ou associada a um carreador(4,26,36).

Com o avanço das pesquisas, iniciou-se a manufatura e o uso de materiais inertes em formato de arcabouço. A primeira geração foi fabricada com materiais que não interagem com os tecidos vizinhos. A segunda geração incluiu materiais bioativos, na superfície dos quais aconteciam reações bioquímicas para osteointegrá-los aos tecidos circundantes. A terceira geração, atualmente em produção e uso, procura imitar as estruturas próprias do tecido ósseo, como as trabéculas do osso medular e a matriz extracelular e manter a associação com os

materiais bioativos da segunda geração. Além de substituir o fragmento de osso perdido tem por função estimular células e vasos sanguíneos para o tecido regenerar(9,14).

Um dos tipos de material inerte são os polímeros. São definidos como macromoléculas compostas de cadeias de monômeros unidas por ligações covalentes; os monômeros podem ser iguais ou diferentes, sendo, respectivamente, homo-polímeros ou co-polímeros. Em relação a suas propriedades gerais são amorfos, cristalinos e biodegradáveis. Em relação à classificação, podem ser naturais ou sintéticos(2,37).

Os polímeros naturais podem ser arcabouços bem indicados para adesão e crescimento celular devido à sua biocompatibilidade, hidrofobicidade e estabilidade estrutural, porém, a falta de propriedades mecânicas adequadas para resistir às forças que incidem sobre os ossos contraindicam o seu uso(5,8).

Os polímeros sintéticos apresentam melhora nas propriedades mecânicas e podem ser moldados em diferentes formas. Podem ser fabricados na exata forma do defeito ósseo ou do local que necessita reconstrução(5,8). Dentre os polímeros sintéticos o grupo de interesse é o dos poliésteres. Alguns exemplos são ácido poli-glicólico (PGA), ácido poli-lático (PLA) e poliglactina 910, material usado para fabricação de fio de sutura reabsorvível(2).

Das propriedades gerais, a biodegradação é fator importante a ser considerado. Ela é realizada por enzimólise e/ou hidrólise, quando o material entra em contato com os fluidos corporais. Ocorre a quebra de macromoléculas em micromoléculas e, em menor quantidade, dióxido de carbono e água. A remoção dos subprodutos monoméricos é realizada pelo processo fisiológico de excreção. A resistência mecânica, diretamente relacionada com a biodegradação, é lenta no primeiro estágio da degradação e rápida ao final da mesma(2).

Com o entendimento dos polímeros, surge a ideia dos compósitos, que são a combinação de dois ou mais polímeros. Eles têm sido desenvolvidos para suprir as deficiências dos polímeros usados individualmente, principalmente a falta de resistência mecânica. Para corrigir isso, deve-se usar dois polímeros ou um polímero associado a material biocerâmico (biovidro, hidroxiapatita, fosfato de cálcio). Esta opção visa aumentar a resistência mecânica e ter propriedades osteocondutoras. Propriedades osteoindutoras podem ser conseguidas por associação com as proteínas morfogenéticas ósseas, fatores de crescimento ou aspirado de medula óssea. Dessas combinações surgem compósitos com propriedades melhores do que as das fórmulas convencionais e individuais de cada material. Outra opção é a nanotecnologia que, pela adição de nanopartículas, aumenta as propriedades mecânicas, melhora a bioatividade e a taxa de reabsorção do compósito(4,17,19,22,36,37).

Para aplicações biológicas, uma das características mais importantes de um compósito é sua biocompatibilidade e interação com os tecidos vivos. As características necessárias para essa interação são: (1) uma superfície que permita os processos celulares sobre ela; (2) ausência de resposta inflamatória e tóxica do material ou dos subprodutos da degradação; (3) grande quantidade de poros interconectados; (4) ampla área de superfície e espaço suficiente para deposição de matriz extracelular; (5) reabsorção controlada simultânea à formação de novo osso; (6) possibilidade de construção como arcabouço tridimensional (32).

#### 1.4 BIOVIDROS

Biovidros ou vidros bioativos são materiais sólidos compostos de óxido de sódio, óxido de cálcio, dióxido de silício e fósforo. Fazem parte dos materiais biocerâmicos e apresentam propriedades semelhantes ao osso no que diz respeito à formação dos cristais de apatita. São materiais sintéticos, biocompatíveis, capazes de interagir com o tecido do hospedeiro devido à liberação de íons quando em contato com tecidos vivos. Para que isso ocorra, a composição e a microestrutura são fundamentais para a habilidade de promover tecido ósseo(4,8,13,14,21).

O primeiro biovidro 45S5, patenteado com a marca Bioglass, foi descoberto em 1969 e usado a partir de 1985. Seu uso em pesquisa demonstrou a capacidade osteocondutiva deste material. O segundo a ser desenvolvido foi o 1393 com a vantagem de ser moldado em arcabouço, o que aumenta suas propriedades mecânicas em relação ao 45S5(13).

Biovidros liberam íons no momento da sua implantação, e por consequência, se unem ao osso do hospedeiro e criam um ambiente favorável à osteocondução. Para isso, depende do pH do meio e da quantidade de silício contido no vidro. Em relação ao pH, os íons são liberados e a sílica se une ao  $H^+$ , em meio aquoso, deixando o meio com aumento de  $OH^-$  e alcalinização. Para isso, a quantidade ideal é de 45% a 52% de sílica. A bioatividade ocorre porque a sílica se quebra em contato com os fluidos corporais, e se une ao osso, tanto mecânica quanto quimicamente, resultando na deposição de uma camada de hidroxiapatita. Isso resulta em alta osteointegração na interface osso do hospedeiro/vidro bioativo(4,8,34,38). A liberação dos íons Si, Ca, P e Na, solúveis, como resultado da degradação do vidro é citado como o que confere as propriedades osteocondutora e, conseqüentemente, osteogênica dos biovidros(13,14).

Como vantagens deste material, podem ser citadas: biocompatibilidade, alta taxa de osteointegração, osteocondução, porosidade adequada, habilidade de modificar sua composição, boa reabsorção, propriedades mecânicas semelhantes às do tecido ósseo. Podem ser moldados em diferentes formas, como esferas, implantes, arcabouços, pastas e fibras(4,9).

Dentre os íons, muitos são usados para estimular a osteogênese, entre eles: nióbio, bório, magnésio, alumínio, cobre, entre outros(8,39). Dentre eles estão os metais raros, como bório e nióbio. Dentre as principais vantagens destes metais estão: a possibilidade de serem associados em compósitos, biocompatibilidade, ausência de citotoxicidade. Também merecem destaque as propriedades de bioatividade e resistência mecânica. Quando um metal é considerado para ser parte de um compósito é importante que a associação resulte em uma resistência mecânica semelhante à do osso cortical. Neste cenário, o nióbio apresenta comportamento bioativo e aumenta a resistência mecânica de um compósito. Quando associado ao biovidro, proporciona uma resistência mecânica parecida com a do osso cortical e melhora a propriedade de bioatividade do biovidro(8,37,38,39,40).

### 1.5 PBAT

O polímero usado nesta tese é o poli (butileno adipato co-tereftalato) (PBAT). É um copoliéster alifático-aromático derivado dos monômeros 1,4-butanediol, ácido tereftálico e ácido adípico. Foi sintetizado pela primeira vez em 1995 com o objetivo de se criar um material com as propriedades mecânicas de flexibilidade e dureza, e com a propriedade térmica de biodegradação. Este material tem sido comercializado pela BASF com o nome de Ecoflex e pela Eastman Chemical com o nome de Easter-bio(17,33,37,41).

A combinação das porções alifática e aromática é importante para que se forme um material com as melhores características dos dois grupos. Os poliésteres alifáticos apresentam biodegradação controlada e são flexíveis, porém, não apresentam propriedades térmicas e mecânicas suficientes para uso em engenharia tecidual. Por outro lado, os poliésteres aromáticos suprem as características mecânicas, mas são resistentes à biodegradação. Em combinação, pode-se fabricar compósitos viáveis para uso como substituto ósseo(17,33,41,42).

O PBAT é um polímero relativamente novo para aplicações na área da saúde. Apresenta características semelhantes a outros polímeros, como baixa cristalinidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e alta flexibilidade, pouca resistência mecânica, baixa bioatividade e hidrofobicidade(37,41,43).

Ele pode ser fabricado em diferentes formatos e por diferentes métodos. Os formatos se dividem, basicamente em duas (2D) e três dimensões (3D). PABT em duas dimensões é usado como um filme não-poroso para liberação de medicamentos, por exemplo. Em três dimensões, como malhas, arcabouços. As malhas são usadas como membranas e os arcabouços para substituir osso, tendão e cartilagem(7,32,33,37,41).

Arslan et al, em 2017, caracterizaram o PBAT puro para uso em engenharia tecidual e enumeraram propriedades importantes para sua aplicação como substituto ósseo. Para isso, eles fabricaram corpos de prova de PBAT em 2D e 3D. Os corpos de prova em 2D foram filmes não-porosos de nano-fibras de 400 $\mu$ m de espessura. Os corpos de prova em 3D foram arcabouços com porosidade entre 62% e 90% e poros de 283 $\mu$ m interconectados uns aos outros. Nas imagens de microscopia eletrônica foi possível observar a superfície rugosa de todos os corpos de prova, o que favorece os processos celulares(33).

Por outro lado, Nar et al, 2014, fabricaram malhas porosas, que foram um ótimo suporte para tecidos moles quando usadas como membranas. Com rugosidade de superfície, estrutura porosa e poros interconectados, influenciaram todos os processos celulares da osteogênese. No seu estudo, estes autores testaram malhas de PBAT 100% e blendas de malhas de PBAT 80% + PHBV 20% poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate). Como resultado, os materiais apresentaram biodegradação em 2 semanas associado a adesão, crescimento celular e produção de matriz colagenosa na superfície do polímero, o que sugere que os sub-produtos da biodegradação não foram tóxicos. Ambos podem ser usados como substitutos ósseos, porém, a melhor resposta celular foi com a blenda PBAT 80. Isso mostra que existe a possibilidade de se fabricar um polímero ou um compósito com as propriedades mecânicas necessárias à área que será reabilitada. Pela mudança nas porcentagens de cada material pode-se chegar a uma blenda adequada para cada reabilitação(21).

## 1.6 MOBD

Matriz óssea bovina desmineralizada (MOBD) (Bio-Oss, Geistlich, Germany) é um material sintético, xenógeno, inorgânico, de origem bovina, granulado, biocompatível e não-antigênico. Caracteriza-se por ser uma matriz óssea mineral porosa, com uma composição biológica, física, química e microestrutural semelhante ao osso humano. Como estrutura, é formado por cristais de hidroxiapatita, com a mesma orientação e tamanho dos cristais do osso humano; tem baixa cristalinidade. Apresenta uma rede de poros interconectados divididos em macroporos (de 300-1500nm) e microporos (do tamanho dos canais haversianos e dos canais vasculares da medula) e espaços entre os cristais (de 3-26nm), resultando em uma porosidade de 70-75%. Sua composição por hidroxiapatita permite que seja usado como arcabouço e favoreça que osteoblastos sejam aderidos à sua superfície e produzam matriz de novo osso ao redor(19,35).

Quando colocado em defeitos ósseos, oferece estabilidade ao coágulo, osteocondutividade, e previne perda de volume na fase de retração da ferida(35). Materiais em

grânulos ocupam o espaço do defeito semelhantemente a um arcabouço 3D e ao osso trabecular, com a microarquitetura de poros interconectados. Eles criam uma macroporosidade que permite a entrada de fluidos, células ósseas e vasos, em direção centrípeta, a partir dos tecidos adjacentes. Os espaços entre os grânulos mimetizam poros interconectados e favorecem estas migrações quando são maiores que 300 $\mu$ m, abertos e interconectados(44).

Como propriedades em relação ao tecido ósseo, é osteocondutor e permite a formação de osso, vasos sanguíneos e matriz extracelular de alta celularidade. Sua taxa de reabsorção é lenta. Não apresenta propriedades osteoindutoras(19,25,35).

Do mesmo modo que os polímeros, pode ser associado a outros biomateriais e aos diferentes tipos de enxertos(42,45). As associações somam as propriedades de cada material e devem ser usadas dependendo do objetivo específico de cada reabilitação. No trabalho de Ge, et al, 2018, ele foi associado ao osso autógeno na proporção de 1:1. Os resultados obtidos mostraram um osso de melhor qualidade, taxa de crescimento mais rápida e maior volume final. O osso autógeno, neste caso, atuou como osteoindutor, acelerando a osteogênese e a mineralização(35).

Em seguida ao exposto sobre o estado da arte de enxertos e substitutos ósseos, cabe uma justificativa desta tese. A reabilitação óssea em casos de perda de estrutura por trauma ou patologias é um desafio para cirurgias buco-maxilo-faciais. Muitos fatores precisam ser considerados para a realização da reabilitação: local/extensão da perda óssea, disponibilidade de tecido mole, saúde do paciente e tipo de enxerto ou substituto ósseo a empregado.

O padrão-ouro para este reparo é o enxerto ósseo autógeno. Porém, suas desvantagens são vastamente discutidas na literatura, principalmente pela necessidade de dois sítios cirúrgicos. Por esse motivo, a pesquisa de um substituto ósseo é importante.

Neste cenário surgiu o uso de polímeros, fabricados em laboratório, sem o uso de matéria animal e com a possibilidade de usar tecnologia controlada para definir melhor suas propriedades biológicas, químicas, físicas e mecânicas. As primeiras pesquisas mostraram que o uso de um polímero, em formato de arcabouço, associado a células ou íons trazem os melhores resultados.

Esta tese apresenta o teste, *in vivo*, de um compósito do polímero poli(butileno) adipato co-tereftalato (PBAT) com biovidro e nióbio (PABT/BAGNb). O PBAT é um polímero usado na indústria e que foi testado para uso como substituto ósseo pelas razões apresentadas na introdução. Dentre elas, a principal é a possibilidade de ser um material biocompatível possível de ser moldado na forma do defeito cirúrgico. O biovidro tem propriedade osteocondutora e o nióbio favorece a osteogênese quando associado a biovidro. Cada um deles foi associado, em

pesquisas prévias, a muitos substitutos ósseos com bons resultados. Então, a ideia de associar estes 3 biomateriais se justifica para que se somem as propriedades de cada um deles em um novo compósito.

Como embasado pela literatura, a escolha do tipo de enxerto ou de substituto ósseo é determinante no sucesso dos procedimentos de reabilitação. Com atenção às propriedades já citadas, a combinação de materiais que esta tese apresenta é inédita. A caracterização do material e os testes laboratoriais foram realizados previamente, em artigo já publicado(46).

Com base no exposto, o objetivo desta tese foi avaliar, através de histomorfometria e análise descritiva, o reparo ósseo, *in vivo*, de um compósito de PBAT – poli (butileno adipato co-tereftalato) - associado a biovidro e nióbio (PBAT/BAGNb), como substituto ósseo, em comparação com controle negativo (ausência de enxerto), controle positivo (osso autógeno) e MBOD.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

Research, Society and Development, v. xx, n. x, eXX, 2022  
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i4.XXXXX>

---

### **Avaliação do reparo ósseo com uso de compósito de poli (butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) associado a biovidro e nióbio**

**Evaluation of bone repair using a poly(butylene adipate co-tereftalate) (PBAT) composite associated with niobium-doped bioglass**

**Evaluación de la reparación ósea mediante composite de poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) associado a biovidro y niobio**

Recebido: | Revisado: | Aceito: | Publicado:

**Lucienne Miranda Ulbrich**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1503-1163>  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil  
E-mail: [lucienneulbrich@gmail.com](mailto:lucienneulbrich@gmail.com)

**Deise Ponzoni**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2855-7495>  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil  
E-mail: [deponzoni@yahoo.com](mailto:deponzoni@yahoo.com)

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** biomateriais têm sido desenvolvidos para uso como substitutos ósseos para a recuperação funcional e estética de perdas de estrutura óssea por trauma ou patologias. Os compósitos à base de polímeros biodegradáveis têm se mostrado uma opção terapêutica promissora. **OBJETIVO:** avaliar o reparo ósseo, *in vivo*, de um compósito de poli (butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) associado a biovidro e nióbio em fêmures de ratos (PBAT/BAGNb). **METODOLOGIA:** cento e quarenta ratos foram divididos em 4 grupos, sendo (1) controle negativo sem preenchimento; (2) controle positivo com osso autógeno; (3) matriz óssea bovina desmineralizada (MOBD); e, (4) compósito de PBAT/BAGNb. No fêmur de cada rato foi criado um defeito cirúrgico crítico de 2mm de diâmetro por 2mm de profundidade. Cada grupo foi preenchido com o respectivo enxerto ou substituto ósseo, com exceção do grupo controle negativo. O compósito foi fabricado como arcabouço tridimensional nas dimensões do defeito. Os tempos experimentais foram de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Os

fêmures foram submetidos às análises qualitativa e histomorfométrica. Os dados qualitativos foram descritos e os dados quantitativos foram tabulados e submetidos à análise estatística. **RESULTADOS:** na análise qualitativa, o compósito formou osso em um padrão de osteogênese ao redor do compósito; os grupos autógeno e MOBD formaram osso como descrito em estudos prévios; no grupo controle não ocorreu formação de osso no interior do defeito. Os dados quantitativos mostraram neoformação óssea em todos os grupos, com maior área de neoformação para o grupo MOBD ( $39,2\pm 10,29\%$ ), seguida pelo enxerto autógeno ( $36,5\pm 13,05\%$ ), pelo grupo controle ( $24,9\pm 6,67\%$ ), e pelo grupo PBAT/BAGNb ( $12,3\pm 5,63\%$ ). Houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos, com exceção dos grupos autógeno e MOBD, quando analisados entre si. **CONCLUSÃO:** o compósito de PBAT/BAGNb formou osso em um padrão de neoformação ao redor do arcabouço e dentro dos poros, porém, em pequena quantidade de área de neoformação óssea ( $12,3\pm 5,63\%$ ) em comparação aos demais grupos estudados.

Palavras-chave: tecido ósseo; engenharia tecidual; experimentação animal; enxertos ósseos; materiais biocompatíveis.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** biomaterials have been developed to enhance functional and aesthetic repair due to bone loss from trauma or pathologies. Composites based on biodegradable polymers have been a promising therapeutic option. **OBJECTIVE:** to assess the bone repair, *in vivo*, with a composite of poly (butylene adipate co-terephthalate) and niobium-doped bioglasses (PBAT/BAGNb), in rat femurs. **METHODOLOGY:** one hundred and forty rats were divided into 4 groups: (1) sham control without filling; (2) positive control with autogenous bone graft; (3) demineralized bovine bone matrix (MOBD); and, (4) PBAT/BAGNb composite. A surgical defect of 2mm diameter per 2 mm depth was surgically created on each femur. Each group received a bone graft or biomaterial; the sham group did not receive filling. The composite was designed and printed as a tridimensional scaffold within the shape of the surgical defect. The experimental periods were 15, 30 and 60 post-operative days. The femurs were submitted to qualitative and histomorphometric analysis. The qualitative data were described. The quantitative data were submitted to statistical analysis. **RESULTS:** the qualitative analysis showed an osteogenic pattern around the scaffold as well as inside its pores; the autogenous and MOBD groups showed the same neoformation as described in previous studies; in the control groups there was no complete bone formation. The quantitative data showed that bone neoformation occurred in all the groups, with the larger neoformation area for MOBD ( $39,2\pm 10,29\%$ ), followed by autogenous bone graft ( $36,5\pm 13,05\%$ ), control group ( $24,9\pm 6,67\%$ ), and, PBAT/BAGNb ( $12,3\pm 5,63\%$ ). There was statistically significant difference among all groups, except for groups autogenous and MOBD. **CONCLUSION:** PBAT/BAGNb composite enhanced the bone formation in and around the scaffold, however, in small amount of newly formed bone area ( $12,3\pm 5,63\%$ ) compared to the other groups. Keywords: bone and bones; tissue engineering; animal experimentation; bone graft; biocompatible materials.

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** se han desarrollado biomateriales para su uso como sustitutos óseos para la recuperación funcional y estética de pérdidas de estructura ósea por traumatismos o patologías. Los composites basados en polímeros biodegradables han demostrado ser una opción terapéutica prometedora. **OBJETIVO:** evaluar la reparación ósea, *in vivo*, de un compuesto de poli(butil adipato co-tereftalato) (PBAT/BAGNb) asociado con biovidrio y nióbio en fêmures de rata. **METODOLOGÍA:** ciento diecinueve ratas fueron divididas en 4 grupos, siendo (1) control negativo sin relleno; (2) control positivo con hueso autógeno; (3) matriz ósea bovina desmineralizada (MOBD); y, (4) compuesto de PBAT/BAGNb asociado con biovidrio y nióbio. Se creó un defecto quirúrgico crítico que medía 2mm de diámetro por 2mm de profundidad en el fémur de cada animal. Cada grupo se rellenó con el respectivo injerto o sustituto óseo, con excepción del grupo de control negativo. El material compuesto se fabricó como un andamio tridimensional en las dimensiones del defecto. Los tiempos experimentales fueron 15, 30 y 60 días postoperatorios. Los fêmures se sometieron a análisis histomorfométrico. Los datos fueron tabulados y sometidos a análisis estadístico. **RESULTADOS:** la neoformación ósea ocurrió en todos los grupos, con mayor área de neoformación para el grupo MOBD ( $39,2\pm 10,29\%$ ), seguido del injerto autógeno ( $36,5\pm 13,05\%$ ), del grupo control ( $24,9\pm 6,67\%$ ), y por el grupo PBAT/BAGNb ( $12,3\pm 5,63$ ). Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos, con la excepción de los grupos autógenos y MOBD, cuando se analizaron entre sí. En el grupo PBAT/BAGNb, el hueso recién formado rodeó la estructura y penetró en los poros creados por la estructura tridimensional, incluso en pequeñas cantidades. No se observaron reacciones inflamatorias ni toxicidad local. **CONCLUSIÓN:** el compuesto PBAT/BAGNb asociado con biovidrio y nióbio formó hueso alrededor de la estructura y dentro de los poros, en una pequeña cantidad de área de neoformación ósea ( $12,3\pm 5,63\%$ ) en comparación con los otros grupos estudiados.

Palabras clave: huesos; ingeniería de tejidos; experimentación animal; trasplante óseo; materiales biocompatibles.

## 1. Introdução

A reabilitação óssea dentro da especialidade da Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais é um desafio para a equipe cirúrgica. Como o osso é um tecido conjuntivo com a capacidade de fazer o reparo morfológico e funcional depois de sofrer perda de estrutura, seja por fratura ou trauma, essa capacidade permite a estimulação deste tecido por diferentes enxertos e substitutos ósseos (Jo, Kim & Choi, 2018; Li *et al.*, 2019).

O enxerto ósseo autógeno é o padrão-ouro para reabilitação. Apresenta propriedades osteoindutivas e osteocondutivas e, com isso, favorece a osteogênese em quantidade e qualidade ideais. Porém, está bem caracterizado na literatura, as desvantagens do osso autógeno, em relação a necessidade de um segundo sítio cirúrgico, risco aumentado de infecção e hemorragia, quantidade limitada de osso, pouca resistência mecânica ao ser enxertado e maior tempo até a osteointegração e reabilitação funcional (Pérez-Sayáns *et al.*, 2019; Sheikh *et al.*, 2015; Walsh *et al.*, 2017).

Para substituição de tecido ósseo com biomateriais, a literatura mostra os melhores resultados com o uso de arcabouços tridimensionais (Zhang *et al.*, 2021). O padrão-ouro é o MOBD, um material sintético, xenógeno, inorgânico e granulado. Caracteriza-se por uma matriz óssea mineral porosa, com composição biológica, física, química e micro-estrutural semelhante ao osso humano. A disposição dos grânulos forma uma rede de poros interconectados que se assemelha a uma estrutura de arcabouço tridimensional. É osteocondutor e permite a formação de osso e vasos sanguíneos ao redor dos grânulos (Arbez *et al.*, 2019; Ge *et al.*, 2018; Subhpradha, Abudhahir, Aathira, Srinivasan & Moorthi, 2018).

Dentre os substitutos ósseos destacam-se os polímeros. Os polímeros surgiram como uma opção inerte, não derivada de animais ou seres humanos e que podem ser associados a outros biomateriais para a formação de compósitos. O objetivo principal da formação de compósitos é reproduzir as propriedades de biocompatibilidade, osteoindutividade e osteocondutividade para atingir uma neoformação óssea semelhante à do enxerto autógeno ou do MOBD.

O poli (butileno adipato co-tereftalato) é um co-poliéster alifático-aromático derivado dos monômeros 1,4-butanediol, ácido-tereftálico e ácido adípico. Foi sintetizado pela indústria para substituto do plástico e já aplicado como substituto ósseo (Fukushima, Wu, Bocchini, Rasyida & Yang, 2012; Arslan, Çakmak, Cengiz & Gümüşderelioglu, 2016; Arslan, Çakmak & Gümüşderelioglu, 2018). Tem como características biocompatibilidade, biodegradação controlada e flexibilidade. Pode ser usado em compósitos e fabricado por diferentes métodos, o que aumenta suas possibilidades de uso. Apresenta como desvantagens a ausência de propriedades osteoindutoras ou osteocondutoras e pequena resistência mecânica (Santana-Melo *et al.*, 2017; Arslan *et al.*, 2018).

Os biovidros são materiais biocerâmicos sólidos que apresentam propriedades semelhantes ao osso na formação dos cristais de apatita, resultando em propriedades mecânicas ideais para uso como substituto ósseo, quando combinados a outros biomateriais (Bi, Zobell, Liu, Rahaman & Bonewald, 2014; Chlanda *et al.*, 2019). Em contato com o osso, interagem com o tecido do hospedeiro, favorecendo a bioatividade, a osteointegração e a osteotransdutividade (Chen, Tien, Chuang & Chen, 2019; Balbinot *et al.*, 2018; Ulbrich *et al.*, 2021). Recentemente, íons usados para estimular a osteogênese foram adicionados aos biovidros, incluindo íons raros, como bório e nióbio. Este último tem comportamento bioativo e, quando associado ao biovidro, aumenta a resistência mecânica do biomaterial (Arslan *et al.*, 2018; Balbinot, Leitune, Ponzoni & Collares, 2019; Pantulap, Arango-Ospina & Boccaccini, 2021).

Este estudo tem por objetivo avaliar a o reparo ósseo com o uso de um compósito de PBAT, biovidro e nióbio. A associação se justifica por congregar em um único substituto ósseo as características do PBAT (um material inerte, biocompatível, sem riscos de imunogenicidade e/ou transmissão de doenças) com o biovidro (osteocondutor, bioativo, com propriedades mecânicas semelhantes às do osso humano) e nióbio (aumento de resistência mecânica).

## 2. Metodologia

A pesquisa experimental, em modelo animal, foi aprovada pelo CEP - Comitê de Ética em Pesquisa - da Universidade Positivo, sob o número 411.

### 2.1 Protocolos de tratamento

Foi utilizado um compósito de PBAT com biovidro e nióbio (BAGNb) na proporção de 10% em peso do compósito. A porosidade média foi de 72,17% ( $\pm 6,94$ ), com poros de 465,03 $\mu$ m ( $\pm 25,84$ ) (Ulbrich, 2021).

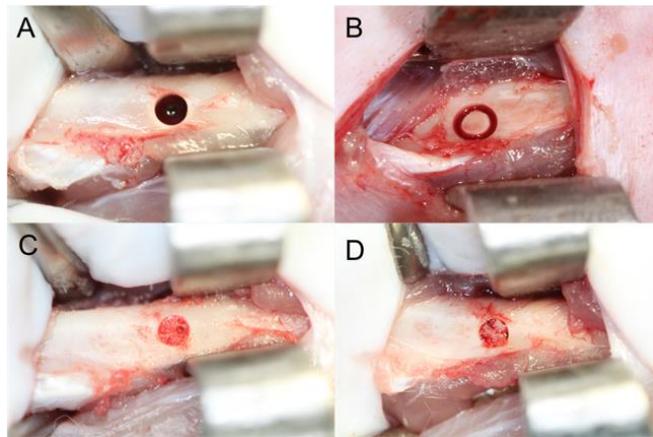
Cento e quarenta ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar) foram submetidos à intervenção cirúrgica para a criação de um defeito cirúrgico crítico no fêmur. Eles foram randomizados em 4 grupos: (1) controle negativo sem preenchimento do defeito; (2) controle positivo com preenchimento do defeito com enxerto ósseo autógeno; (3) MOBD, com tamanho dos grânulos de 0,25-1mm; (4) compósito de PBAT/BAGNb (Figuras 1 e 2). Todos os enxertos e substitutos, aplicados no trans-cirúrgico, preencheram a totalidade do defeito ósseo.

Figura 2. Compósito de PBAT/BAGNb.



A figura 1 mostra o compósito de PABT/BAGNb com a arquitetura tridimensional e a estrutura de poros. A porosidade média foi de 72,17% ( $\pm 6,94$ ), com poros de 465,03 $\mu\text{m}$  ( $\pm 25,84$ ) (Ulbrich, 2021).

Figura 2. Grupos experimentais com o defeito cirúrgico criado nos fêmures dos ratos e os respectivos preenchimentos.



Fonte: autores

A figura 2 mostra o protocolo experimental. (A) Defeito sem preenchimento por enxerto ou substituto ósseo. Observa-se o coágulo preenchendo a região. (B) Defeito preenchido por osso autógeno retirado do próprio defeito e reinserido no local. (C) Defeito preenchido por MOBD. Observam-se os grânulos do substituto ósseo e a compactação do material e do sangue na cavidade. (D) Defeito preenchido pelo compósito de PBAT/BAGNB associado a biovidro e com nióbio. Observa-se, parcialmente, a arquitetura tridimensional do substituto ósseo e o sangue dentro da sua macroestrutura.

## 2.2 Animais e procedimento cirúrgico

Os ratos pesavam 350 $\pm$ 50g, se alimentavam de ração padrão para a espécie e água *ad libitum*, permaneceram em sala com temperatura controlada de 21 $\pm$ 2°C, umidade relativa do ar entre 40% e 60%, sistema de exaustão de ar e ciclo claro-escuro de 12 horas. Cada animal foi anestesiado com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (90mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10mg/Kg). A anestesia foi mantida com isoflurano vaporizado em oxigênio 100%. Como anestesia local infiltrativa, foi administrado cloridrato de mepivacaína 2% com epinefrina 0,018mg, na dose de 0,5ml. O lado do fêmur, para criação do defeito ósseo, foi randomizado. A pele da região femural foi tricotomizada e recebeu antisepsia por iodo polivinilpirrolidona (PVPI) tópico a 10%.

Foi realizada uma incisão de 1cm de comprimento sobre a área do fêmur, seguida da divulsão tecidual por planos e exposição da sua diáfise lateral. Foi realizado um defeito cirúrgico com trefina (Promm, Porto Alegre, Brasil) em baixa rotação sob irrigação constante de soro fisiológico a 0,9%. As dimensões do defeito cirúrgico foram de 2mm de diâmetro por 2mm de profundidade. Cada defeito cirúrgico recebeu o tratamento conforme randomização prévia. Os defeitos foram preenchidos na sua totalidade. O osso autógeno foi retirado do próprio defeito ósseo e reinserido na cavidade. A MOBD, comercialmente disponível e previamente esterilizada por

radiação gama, foi colocada até o preenchimento total do defeito. O compósito, esterilizado em autoclave, foi fabricado nas dimensões do defeito e preencheu toda a cavidade (Figura 2).

A sutura dos planos profundos foi realizada com fio de poliglactina 910, 4.0 e a sutura da pele com fio de mononylon 5.0. Os cuidados pós-operatórios foram realizados diariamente e acompanhados por médico veterinário. A medicação pós-operatória intramuscular foi enrofloxacino 10mg/Kg a cada 24 horas por 7 dias; morfina 5mg/Kg em dose única e cloridrato de tramadol 7mg/Kg a cada 12 horas por 5 dias.

Os tempos experimentais foram de 15, 30 e 60 dias. Os animais foram mortos pelo método químico de sobredose anestésica com isoflurano vaporizado em oxigênio 100%, por via inalatória. Os fêmures foram retirados e conservados em formol a 10%.

### 2.3 Preparo histológico e análise

Os fêmures foram descalcificados em ácido fórmico, seccionados no seu longo eixo, processados e emblocados em parafina, de modo que os cortes histológicos iniciassem a partir do centro do defeito. Em seguida, foram realizados cortes de 5µm de espessura e corados com HE para as análises qualitativa e histomorfométrica.

As lâminas foram escaneadas pelo Scanner Zeiss/MetaSystems (Oberkochen, Alemanha) e as fotos foram capturadas no programa Zen Blue 3.4 na objetiva de 25X.

Para análise qualitativa foram separadas imagens capturadas, na quantidade de 4 imagens por tempo, por grupo. Foi realizada a descrição de: fechamento ou não da cortical superior do defeito, mineralização do interior da cavidade; presença residual de substituto e padrão de neoformação óssea.

Para avaliar a área de neoformação óssea, um programa de imagem Image Pro Plus (Image Pro Plus, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) foi calibrado com uma máscara para seleção de tecido ósseo mineralizado. O limite da máscara foi selecionado para inclusão de osso cortical e exclusão de tecido medular. A área do defeito cirúrgico foi medida e definida como a região de interesse (RI); em seguida, foi utilizada a máscara para definição da área de neoformação óssea (RN), dentro da área de interesse (RI). A razão  $((RI/RN)*100)$  forneceu a porcentagem de osso neoformado.

### 2.4. Análise estatística

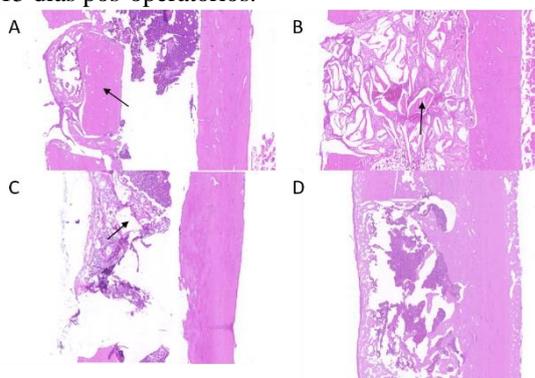
Para a análise estatística, a normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, resultando em dados com distribuição normal. A variável contínua foi estabelecida como a área de neoformação óssea. O teste ANOVA de uma via foi utilizado para comparação entre todos os grupos e, também, para a comparação entre os tempos de um mesmo grupo. O teste t de Student foi utilizado para comparação do mesmo tempo entre diferentes grupos. Valores de  $p < 0,05$  indicam diferença estatística. O Software utilizado foi o JMP (™) Pro 14.0.0. (SAS Institute, Cary, NC).

## 3. Resultados e Discussão

Do total de 140 animais, dois ratos, randomizados para o grupo controle, foram perdidos na indução anestésica. Outras 19 peças anatômicas foram deterioradas no transporte. A amostra final foi de 119 animais, sendo 32 para o grupo autógeno, 29 para o grupo MOBD, 35 para o grupo PBAT/BAGNB e 23 para o grupo controle.

A análise qualitativa está descrita nas figuras 3 a 5.

Figura 3. Grupos experimentais aos 15 dias pós-operatórios.

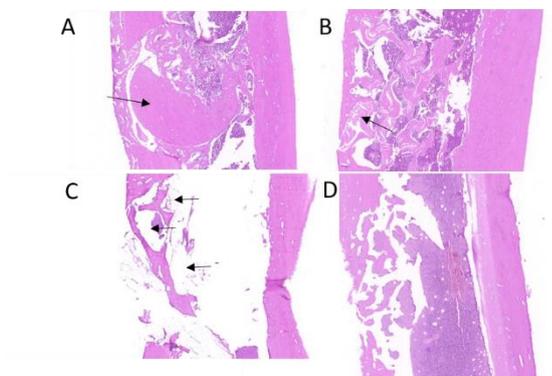


Fonte: autores

Na figura 3 observa-se o início do reparo ósseo. (A) Autógeno: observa-se as margens do defeito cirúrgico e o osso autógeno ao centro (seta). O osso autógeno está envolto por tecido com início da mineralização, sem a coaptação com as margens do defeito. (B) MOBD: os grânulos (seta) estão envolvidos por tecido com início de mineralização; sem coaptação das margens do defeito. (C) compósito de PBAT/BAGNB: o material (seta) está envolto por tecido de alta celularidade, sem início de mineralização. A medula foi perdida durante o preparo

histotécnico. (D) Controle: formação de tecido de alta celularidade entre as margens do defeito, sem união com o tecido das margens do defeito. HE, 25x.

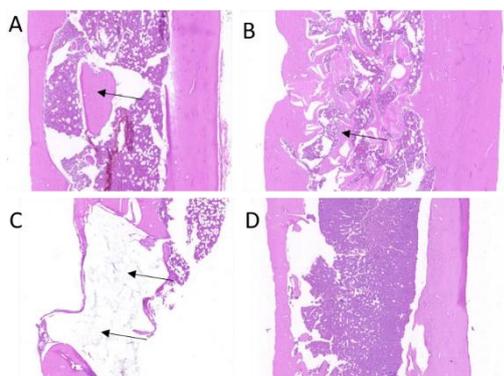
Figura 4. Grupos experimentais aos 30 dias pós-operatórios.



Fonte: autores

Na figura 4 observa-se a metade da análise do reparo ósseo. (A) Autógeno: fechamento da cortical do defeito e substituição parcial do enxerto autógeno (seta) por osso neoformado. (B) MOBD: fechamento da cortical do defeito e maior formação de osso no interior da cavidade, ao redor dos grânulos (seta) em relação a 15 dias. (C) compósito de PBAT/BAGNB: porções do material envoltas em osso cortical e fechamento parcial da cortical do defeito. Material presente no interior da cavidade (setas) sem a medula. (D) Controle: fechamento parcial da cortical do defeito ósseo; alta celularidade no interior do defeito sem mineralização. HE, 25x.

Figura 5. Grupos experimentais aos 60 dias pós-operatórios.

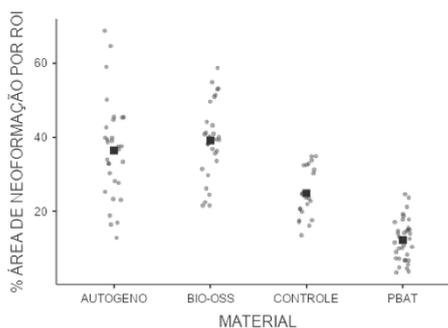


Fonte: autores

Na figura 5 observa-se o final do reparo ósseo. (A) Autógeno: fechamento da cortical do defeito, união dos bordos ósseos e substituição quase total do enxerto autógeno (seta) por osso neoformado. Medula com alta celularidade e gordura. (B) MOBD: fechamento da cortical do defeito, união dos bordos ósseos e mineralização do tecido no interior da cavidade, ao redor dos grânulos (seta); medula preservada. (C) compósito de PBAT/BAGNB: fechamento da cortical do defeito com uma fina camada de osso cortical que margeia o material (setas). Próximo à medula, outra formação cortical, indicando que o tecido ósseo mineralizado circundou o arcabouço tridimensional. Pequena porção de medula preservada, com alta celularidade. (D) Controle: fechamento parcial da cortical do defeito ósseo; alta celularidade no interior do defeito sem mineralização. HE, 25x.

Em relação à análise quantitativa, a média da neoformação óssea e o desvio-padrão foram calculados para os grupos autógeno ( $36,5 \pm 13,05$ ), MOBD ( $39,2 \pm 10,29$ ), PBAT/BAGNB ( $12,3 \pm 5,63$ ) e controle ( $24,9 \pm 6,67$ ). A área de neoformação óssea foi comparada entre os quatro grupos do estudo (Gráfico 1). O protocolo de medição foi descrito por Jo *et al* (2018) e Pérez-Sayáns *et al* (2019).

Gráfico 1. Porcentagem de neoformação óssea nos 4 grupos experimentais.



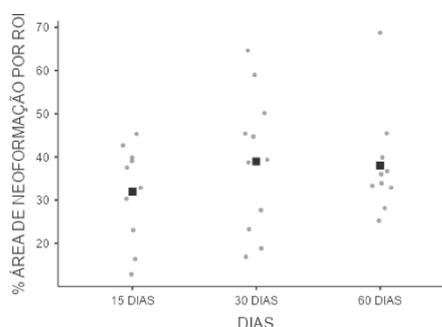
Fonte: autores

O gráfico 1 mostra a comparação dos 4 grupos experimentais. O quadrado preto indica a média de neoformação óssea do grupo e os pontos pretos indicam os animais do referido grupo. Observa-se, graficamente, a proximidade das médias dos grupos autógeno e MOBD. O grupo PBAT/BAGNb apresenta os valores individuais mais próximos da média.

A comparação entre os grupos autógeno e MOBD não mostrou diferença estatística com relação a área de neoformação óssea ( $p=0,6713$ ). Nas demais comparações, ocorreu diferença significativa. O grupo PBAT/BAGNb apresentou diferença estatística em relação a todos os outros grupos (Santana-Melo *et al.*, 2017), porém, com menor diferença e valores bem próximos em relação ao grupo controle. O primeiro teste, *in vivo*, deste compósito se assemelhou ao controle negativo de um defeito crítico. Os autores embasam este resultado pela pequena porcentagem de biovidro e nióbio, o que resulta em menor capacidade osteocondutora. Santana Melo *et al.* (2017) compararam PBAT/BAGNb puro e com adição de 3% e 5% de hidroxiapatita. Em todos os grupos houve neoformação pequena, como neste estudo. Porém, quanto maior a porcentagem de hidroxiapatita, maior a formação de osso maduro (Arslan *et al.*, 2018). Outros arcabouços de polímeros receberam bório, cálcio,  $\beta$ -trifosfato de cálcio para aumento das propriedades osteocondutora (Arslan, *et al.*, 2018; Pantulap *et al.*, 2021). O conceito de que a combinação de materiais osteocondutores aumenta a quantidade e qualidade da formação óssea tem sido descrito na literatura (Arbez *et al.*, 2019; Balbinot *et al.*, 2018; Bi *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2019). O compósito apresentado tem duas substâncias osteocondutoras e que podem ser proporcionadas em diferentes quantidades para maior formação óssea.

Para a comparação entre os tempos do mesmo grupo foi realizada pelo teste ANOVA de uma via. No grupo autógeno, não houve diferença estatística entre os tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios ( $p=0,4340$ ) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Porcentagem de neoformação óssea no grupo autógeno.



Fonte: autores

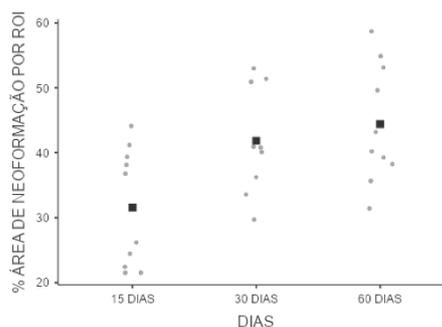
O gráfico 2 mostra a representação gráfica da porcentagem de neoformação óssea do grupo autógeno nos diferentes tempos experimentais. Os tempos de 30 e 60 dias tiveram média muito semelhante, indicando que a substituição do enxerto por osso ocorreu simultaneamente, sem aumento da neoformação óssea aos 60 dias.

Ge, 2018, comparou enxerto autógeno com MOBD e concluiu que ambos tiveram formação óssea semelhante, porém, quando usado em conjunto, o resultado era melhor em quantidade e qualidade do que quando

usados separadamente. Este estudo não testou os dois simultaneamente, porém, os resultados separados mostraram que, tanto o enxerto autógeno, considerado o padrão-ouro com propriedades osteocondutora e osteoindutora, quanto o MOBD, com propriedades osteocondutoras, formaram osso de qualidade e quantidade em 60 dias pós-operatórios.

No grupo MOBD, houve diferença estatística entre os tempos de 15 e 30 ( $p=0,0460$ ) e entre 15 e 60 ( $p=0,0088$ ). Porém, não houve diferença entre 30 e 60 dias pós-operatórios ( $p=0,8029$ ) (Gráfico 3). Isso pode ser explicado pelo padrão de formação óssea ao redor dos grânulos e próximo às margens do defeito, o que faz com que os grânulos atuem como um arcabouço para o reparo ósseo e favorece a formação de tecido entre os mesmos no início do reparo ósseo (Chen *et al.*, 2019; Pérez-Sayáns *et al.*, 2018).

Gráfico 3. Porcentagem de neoformação óssea no grupo MOBD.

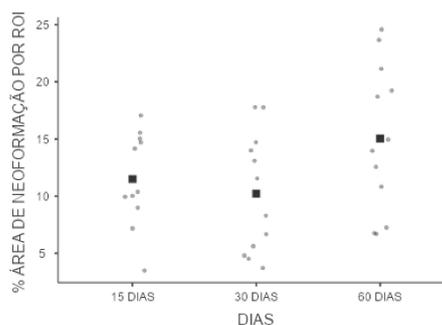


Fonte: autores

Gráfico 3. Representação gráfica da porcentagem de neoformação óssea do grupo MOBD nos diferentes tempos experimentais. A neoformação óssea aumentou ao longo dos tempos experimentais, indicando um efeito osteocondutor contínuo e crescente nos tempos estudados.

No grupo PBAT/BAGNb, não houve diferença estatística entre os tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios ( $p=0,0930$ ) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Porcentagem de neoformação óssea no grupo PBAT/BAGNb.



Fonte: autores

O gráfico 4 mostra a representação gráfica da porcentagem de neoformação óssea do grupo PBAT/BAGNb nos diferentes tempos experimentais. Observa-se que a média de 15 e 30 dias é próxima, porém distante da média de 60 dias. Este resultado sugere que o melhor efeito do compósito foi próximo a 60 dias, ou seja, na cicatrização tardia.

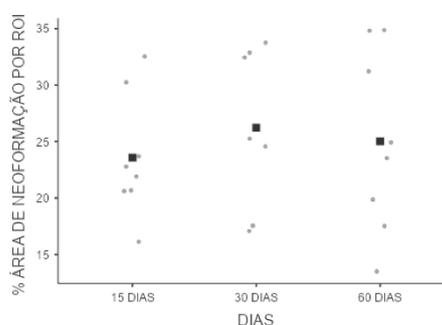
A pequena porcentagem de formação óssea pode ser explicada pela quantidade e padrão dos poros (Arslan *et al.*, 2019; Balbinot *et al.*, 2019). No estudo de Arslan *et al.*, 2018 houve maior formação óssea com arcabouços de PBAT e porosidade de 91%. Nesta configuração, os arcabouços promoveram a adesão, proliferação e diferenciação celular. Porém, a mineralização foi pouco densa. Por outro lado, Arbez *et al.*, 2019, descrevem que poros menores e em menor quantidade permitem uma arquitetura mais compacta do arcabouço. Consequentemente, permitem maior superfície livre de biomaterial disponível para interação de células e tecidos. Neste cenário, a configuração tridimensional do compósito proposto, com média de 70% de porosidade favorece a osteointegração e bioatividade (Bi *et al.*, 2014; Chlanda *et al.*, 2019; Ge *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Pelo padrão de formação óssea que circundou o compósito, pode-se sugerir que a estrutura tridimensional com menor

porosidade favoreceu a interação entre células e tecidos. Porém, devido à pequena porcentagem de biovidro e nióbio, a quantidade de neoformação óssea foi reduzida (Chen *et al.*, 2019; Sheikh *et al.*, 2015).

Na análise trans-operatória do compósito, ele apresentou-se como um material promissor, de fácil esterilização e manipulação. Em primeiro lugar, ele se adaptou bem ao defeito cirúrgico, por ter sido impresso no tamanho da perfuração e por se tornar parcialmente maleável com a exposição ao sangue. A desvantagem foi o tempo de trabalho reduzido, pois quanto mais tempo exposto ao sangue, mais maleável ficava e perdia sua conformação tridimensional. Quando analisados em nanoescala, estes polímeros não mantêm um padrão ordenado da sua arquitetura (Chlanda, 2019) e isso pode explicar a perda da conformação original quando em contato com umidade. Também, nas fotomicrografias, o novo osso circundou as partes do compósito, porém, não na superfície do defeito cirúrgico porque o compósito não apresentou resistência mecânica para preencher todo o defeito e foi deslocado para o fundo da cavidade. O aumento da porcentagem de biovidro e nióbio aumentará as propriedades mecânicas, diminuirá esta flexibilidade e favorecerá o fechamento da cortical do defeito (Ulbrich *et al.*, 2021).

No grupo controle, não houve diferença estatística entre os tempos de 15, 30 e 60 dias pós operatórios ( $p=0,7608$ ) (Gráfico 5).

Gráfico 5. Porcentagem de neoformação óssea no grupo controle.



Fonte: autores

O gráfico 5 mostra a representação gráfica da porcentagem de neoformação óssea do grupo controle nos diferentes tempos experimentais. Média de neoformação semelhante, indicando que o tempo não mudou o resultado, por se tratar de um defeito crítico.

Os resultados do grupo controle são variados na literatura, dependendo da metodologia empregada (Balbinot *et al.*, 2019; Bi *et al.*, 2014; Walsh, et al., 2017). Pérez-Sayáns *et al.* (2018) obtiveram defeitos com crescimento ósseo parcial, semelhante aos resultados deste estudo.

Para a comparação do mesmo tempo experimental nos diferentes grupos, foi usado o teste t de Student, conforme mostra a Tabela 1. A comparação do compósito com cada grupo resultou em diferença estatística significativa, em todos os tempos experimentais. A comparação entre MOBD e autógenos não apresentou diferença estatística.

Um ponto importante e a favor da apresentação deste substituto ósseo inédito é o padrão da neoformação óssea, ao redor do biomaterial, sendo, em um primeiro teste *in vivo*, característica mais importante do que a quantidade de tecido ósseo neoformado. Porém, até 60 dias pós-operatórios, o material não foi reabsorvido e teve sua arquitetura mantida, o que dificultou a neoformação óssea. A taxa de degradação foi avaliada em 10% (Arslan *et al.*, 2018). O biovidro e íons como bório e nióbio apresentaram degradação simultânea à formação de osso em 4 semanas (Chen *et al.*, 2019). Portanto, a falta de degradação ocorreu devido ao PBAT (Fukushima *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2021).

Não foram observadas infecções durante os tempos experimentais, em todos os grupos.

#### 4. Conclusão

Dentro da metodologia testada, o compósito de PBAT/BAGNb foi envolvido por osso neoformado e apresentou pequenas áreas de neoformação nos poros do material. Esse padrão de neoformação foi observado na análise qualitativa nas micrografias. Em relação à quantidade, a média de neoformação óssea no grupo PBAT/BAGNb foi de 12,3% da área do defeito ósseo.

A arquitetura tridimensional, a manipulação cirúrgica e o padrão de neoformação óssea indicam o compósito como um material promissor. Futuras pesquisas poderão adaptar sua composição para favorecer a degradação mais rápida e aumentar a neoformação óssea.

## Referências

- Arbez, B., Kün-Darbois, J. D., Convert, T., Guillaume, B., Mercier, P., Hubert, L., & Chappard, D. (2019). Biomaterial granules used for filling bone defects constitute 3D scaffolds: porosity, microarchitecture and molecular composition analyzed by microCT and Raman microspectroscopy. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 107(2), 415–423. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34133>
- Arslan, A., Çakmak, S., Cengiz, A., & Gümüşderelioğlu, M. (2016). Poly(butylene adipate-co-terephthalate) scaffolds: processing, structural characteristics and cellular responses. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 27(18), 1841–1859. <https://doi.org/10.1080/09205063.2016.1239945>
- Arslan, A., Çakmak, S., & Gümüşderelioğlu, M. (2018). Enhanced osteogenic activity with boron-doped nanohydroxyapatite-loaded poly(butylene adipate-co-terephthalate) fibrous 3D matrix. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup2), 790–799. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1470522>
- Balbinot, G. S., Collares, F. M., Visioli, F., Soares, P., Takimi, A. S., Samuel, S., & Leitune, V. (2018). Niobium addition to sol-gel derived bioactive glass powders and scaffolds: In vitro characterization and effect on pre-osteoblastic cell behavior. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 34(10), 1449–1458. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.06.014>
- Balbinot, G. S., Leitune, V., Ponzoni, D., & Collares, F. M. (2019). Bone healing with niobium-containing bioactive glass composition in rat femur model: A micro-CT study. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 35(10), 1490–1497. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.07.012>
- Bi, L., Zobell, B., Liu, X., Rahaman, M. N., & Bonewald, L. F. (2014). Healing of critical-size segmental defects in rat femora using strong porous bioactive glass scaffolds. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 42, 816–824. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.022>
- Chen, C. L., Tien, H. W., Chuang, C. H., & Chen, Y. C. (2019). A comparison of the bone regeneration and soft-tissue-formation capabilities of various injectable-grafting materials in a rabbit calvarial defect model. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 107(3), 529–544. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34144>
- Chlanda, A., Oberbek, P., Heljak, M., Kijewska-Gawrońska, E., Bolek, T., Gloc, M., John, Ł., Janeta, M., & Woźniak, M. J. (2019). Fabrication, multi-scale characterization and in-vitro evaluation of porous hybrid bioactive glass polymer-coated scaffolds for bone tissue engineering. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 94, 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.062>
- Fukushima, K., Wu, M. H., Bocchini, S., Rasyida, A., & Yang, M. C. (2012). PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 32(6), 1331–1351. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.04.005>
- Ge, J., Yang, C., Wang, Y., Zheng, J., Hua, H., & Zhu, J. (2018). Comparison of different grafting materials for treatment of bone defect distal to the molar in canine. *Clinical implant dentistry and related research*, 20(4), 444–454. <https://doi.org/10.1111/cid.12603>
- Jo, S. H., Kim, Y. K., & Choi, Y. H. (2018). Histological Evaluation of the Healing Process of Various Bone Graft Materials after Engraftment into the Human Body. *Materials (Basel, Switzerland)*, 11(5), 714. <https://doi.org/10.3390/ma11050714>
- Li, X., Yin, H. M., Luo, E., Zhu, S., Wang, P., Zhang, Z., Liao, G. Q., Xu, J. Z., Li, Z. M., & Li, J. H. (2019). Accelerating Bone Healing by Decorating BMP-2 on Porous Composite Scaffolds. *ACS applied bio materials*, 2(12), 5717–5726. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00761>
- Pantulap, U., Arango-Ospina, M., & Boccaccini, A. R. (2021). Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 33(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06626-3>
- Pérez-Sayáns, M., Lorenzo-Pouso, A. I., Galindo-Moreno, P., Muñoz-Guzón, F., González-Cantalapiedra, A., López-Peña, M., Somoza-Martín, M., Gallas-Torreira, M., & García-García, A. (2019). Evaluation of a new

tricalcium phosphate for guided bone regeneration: an experimental study in the beagle dog. *Odontology*, 107(2), 209–218. <https://doi.org/10.1007/s10266-018-0384-z>

Santana-Melo, G. F., Rodrigues, B., da Silva, E., Ricci, R., Marciano, F. R., Webster, T. J., Vasconcellos, L., & Lobo, A. O. (2017). Electrospun ultrathin PBAT/nHAp fibers influenced the in vitro and in vivo osteogenesis and improved the mechanical properties of neoformed bone. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 155, 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.053>

Sheikh, Z., Najeeb, S., Khurshid, Z., Verma, V., Rashid, H., & Glogauer, M. (2015). Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*, 8(9), 5744–5794. <https://doi.org/10.3390/ma8095273>

Su S. (2021). Prediction of the Miscibility of PBAT/PLA Blends. *Polymers*, 13(14), 2339. <https://doi.org/10.3390/polym13142339>

Subhapradha, N., Abudhahir, M., Aathira, A., Srinivasan, N., & Moorthi, A. (2018). Polymer coated mesoporous ceramic for drug delivery in bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 110, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.146>

Ulbrich, L. M., Balbinot, G. S., Brotto, G. L., Leitune, V., Soares, R., Collares, F. M., & Ponzoni, D. (2021). 3D printing of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT)/niobium containing bioactive glasses (BAGNb) scaffolds: Characterization of composites, in vitro bioactivity, and in vivo bone repair. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 10.1002/term.3276. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/term.3276>

Walsh, W. R., Oliver, R. A., Christou, C., Lovric, V., Walsh, E. R., Prado, G. R., & Haider, T. (2017). Critical Size Bone Defect Healing Using Collagen-Calcium Phosphate Bone Graft Materials. *PloS one*, 12(1), e0168883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168883>

Zhang, Z., He, F., Wang, B., Zhao, Y., Wei, Z., Zhang, H., & Sang, L. (2021). Biodegradable PGA/PBAT Blends for 3D Printing: Material Performance and Periodic Minimal Surface Structures. *Polymers*, 13(21), 3757. <https://doi.org/10.3390/polym13213757>

### 3 CONCLUSÃO

Com base na metodologia testada, pode-se concluir que o compósito proposto a base de PBAT/BAGNb associado com biovidro e nióbio estimulou o reparo ósseo ao redor da sua estrutura tridimensional, bem como dentro dos seus poros, em pequena quantidade de tecido neoformado. Porém, o padrão de formação óssea torna este compósito promissor.

A primeira limitação do estudo foi a manipulação cirúrgica do compósito que, em contato com sangue, perdia parte da sua conformação tridimensional. Pela técnica realizada e pelo tamanho do defeito foi possível adaptá-lo na cavidade preservando a conformação inicial. Porém, para a sequência da linha de pesquisa, é importante reavaliar a sua composição, talvez com aumento da quantidade de biovidro para aumento da resistência mecânica, característica que falta no polímero PBAT.

A segunda limitação do estudo foi a descalcificação realizada em ácido fórmico para o primeiro preparo histotécnico e, posteriormente, repetida para que fosse possível fazer o corte do biovidro. Como padronização técnica, o uso do ácido foi o mesmo em todos os grupos. Ao realizar a análise imunohistoquímica, não ocorreu reação do anticorpo. Sugere-se, para pesquisas futuras, desenvolver um protocolo que permita o corte do biovidro sem o uso de ácido fórmico para que seja possível a realização da análise do endotélio dos vasos.

## REFERÊNCIAS

1. Puricelli E, Corsetti A, Ponzoni D, Martins GL, Leite MG, Santos LA. Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calcium phosphate cement and autogenous bone graft. *Head Face Med.* 2010 Jun 28;6:10. doi: 10.1186/1746-160X-6-10. PMID: 20579394; PMCID: PMC2902431.
2. Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z, Verma V, Rashid H, Glogauer M. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. *Materials (Basel).* 2015 Aug 31;8(9):5744-5794. doi: 10.3390/ma8095273. PMID: 28793533; PMCID: PMC5512653.
3. Syftestad GT, Urist MR. Bone aging. *Clin Orthop Relat Res.* 1982 Jan-Feb;(162):288-97. PMID: 7067226.
4. Bhatt RA, Rozental TD. Bone graft substitutes. *Hand Clin.* 2012 Nov;28(4):457-68. doi: 10.1016/j.hcl.2012.08.001. PMID: 23101596.
5. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys.* 2014 Nov 1;561:109-17. doi: 10.1016/j.abb.2014.07.006. Epub 2014 Jul 14. PMID: 25034215.
6. Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone.* 2015 Jan;70:19-27. doi: 10.1016/j.bone.2014.09.017. Epub 2014 Sep 28. PMID: 25263520.
7. Walsh WR, Oliver RA, Christou C, Lovric V, Walsh ER, Prado GR, Haider T. Critical Size Bone Defect Healing Using Collagen-Calcium Phosphate Bone Graft Materials. *PLoS One.* 2017 Jan 3;12(1):e0168883. doi: 10.1371/journal.pone.0168883. PMID: 28045946; PMCID: PMC5207671.
8. Chen X, Zhao Y, Geng S, Miron RJ, Zhang Q, Wu C, Zhang Y. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using PIB nanogels/boron-containing mesoporous bioactive glass composite scaffold. *Int J Nanomedicine.* 2015 Jan 22;10:839-46. doi: 10.2147/IJN.S69001. PMID: 25653525; PMCID: PMC4309792.
9. Chlanda A, Oberbek P, Heljak M, Kijeńska-Gawrońska E, Bolek T, Gloc M, John Ł, Janeta M, Woźniak MJ. Fabrication, multi-scale characterization and in-vitro evaluation of porous hybrid bioactive glass polymer-coated scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Jan 1;94:516-523. doi: 10.1016/j.msec.2018.09.062. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30423736.
10. Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine.* 2017 Jul 12;12:4937-4961. doi: 10.2147/IJN.S124671. PMID: 28761338; PMCID: PMC5516781.
11. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011 Sep 16;146(6):873-87. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.039. PMID: 21925313.
12. Yin J, Gong G, Sun C, Yin Z, Zhu C, Wang B, Hu Q, Zhu Y, Liu X. Angiopoietin 2 promotes angiogenesis in tissue-engineered bone and improves repair of bone defects by

inducing autophagy. *Biomed Pharmacother.* 2018 Sep;105:932-939. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.078. Epub 2018 Jun 19. PMID: 30021387.

13. Bi L, Jung S, Day D, Neidig K, Dusevich V, Eick D, Bonewald L. Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2012 Dec;100(12):3267-75. doi: 10.1002/jbm.a.34272. Epub 2012 Jun 26. PMID: 22733586.

14. Jia W, Lau GY, Huang W, Zhang C, Tomsia AP, Fu Q. Bioactive Glass for Large Bone Repair. *Adv Healthc Mater.* 2015 Dec 30;4(18):2842-8. doi: 10.1002/adhm.201500447. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26582584.

15. Zhang Y, Al-Maawi S, Wang X, Sader R, James Kirkpatrick C, Ghanaati S. Biomaterial-induced multinucleated giant cells express proinflammatory signaling molecules: A histological study in humans. *J Biomed Mater Res A.* 2019 Apr;107(4):780-790. doi: 10.1002/jbm.a.36594. Epub 2018 Dec 28. PMID: 30549210.

16. Chen CL, Tien HW, Chuang CH, Chen YC. A comparison of the bone regeneration and soft-tissue-formation capabilities of various injectable-grafting materials in a rabbit calvarial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019 Apr;107(3):529-544. doi: 10.1002/jbm.b.34144. Epub 2018 May 2. PMID: 29722122.

17. Fukushima K, Wu MH, Bocchini S, Rasyida A, Yang MC. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2012 Aug 1;32(6):1331-51. doi: 10.1016/j.msec.2012.04.005. Epub 2012 Apr 12. PMID: 24364930.

18. Puricelli E, Ulbrich LM, Ponzoni D, Filho JJ. Histological analysis of the effects of a static magnetic field on bone healing process in rat femurs. *Head Face Med.* 2006 Nov 24;2:43. doi: 10.1186/1746-160X-2-43. PMID: 17125508; PMCID: PMC1675997.

19. Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Jun;15(3):315-24. doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.01012.x. PMID: 15142094.

20. Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH, Zöller JE, Kuebler AC. Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: a microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Jul;37(7):651-9. doi: 10.1016/j.ijom.2008.02.005. Epub 2008 Apr 18. PMID: 18378427.

21. Balbinot GS, Collares FM, Visioli F, Soares PBF, Takimi AS, Samuel SMW, Leitune VCB. Niobium addition to sol-gel derived bioactive glass powders and scaffolds: In vitro characterization and effect on pre-osteoblastic cell behavior. *Dent Mater.* 2018 Oct;34(10):1449-1458. doi: 10.1016/j.dental.2018.06.014. Epub 2018 Aug 7. PMID: 29929845.

22. Corsetti A, Bahuschewskij C, Ponzoni D, Langie R, Santos LA, Camassola M, Nardi NB, Puricelli E. Repair of bone defects using adipose-derived stem cells combined with alpha-tricalcium phosphate and gelatin sponge scaffolds in a rat model. *J Appl Oral Sci.* 2017 Jan-

Feb;25(1):10-19. doi: 10.1590/1678-77572016-0094. PMID: 28198971; PMCID: PMC5289395.

23. Li X, Yin HM, Luo E, et al. Accelerating Bone Healing by Decorating BMP-2 on Porous Composite Scaffolds. *ACS Appl Bio Mater.* 2019;2(12):5717-5726. doi:10.1021/acsabm.9b00761

24. Luangphakdy V, Walker E, Shinohara K, et al. Evaluation of osteoconductive scaffolds in the canine femoral multi-defect model. *Tissue Eng Part A.* 2013;19(5-6):634-648. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0289

25. Pérez-Sayáns M, Lorenzo-Pouso AI, Galindo-Moreno P, Muñoz-Guzón F, González-Cantalapiedra A, López-Peña M, Somoza-Martín M, Gallas-Torreira M, García-García A. Evaluation of a new tricalcium phosphate for guided bone regeneration: an experimental study in the beagle dog. *Odontology.* 2019 Apr;107(2):209-218. doi: 10.1007/s10266-018-0384-z. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30094649.

26. Tovar N, Jimbo R, Gangolli R, Perez L, Manne L, Yoo D, Lorenzoni F, Witek L, Coelho PG. Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: an experimental calvaria defect study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Feb;43(2):251-60. doi: 10.1016/j.ijom.2013.07.005. Epub 2013 Aug 12. PMID: 23948358.

27. Cengiz IF, Oliveira JM, Reis RL. Micro-computed tomography characterization of tissue engineering scaffolds: effects of pixel size and rotation step. *J Mater Sci Mater Med.* 2017 Aug;28(8):129. doi: 10.1007/s10856-017-5942-3. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28721665.

28. Jo SH, Kim YK, Choi YH. Histological Evaluation of the Healing Process of Various Bone Graft Materials after Engraftment into the Human Body. *Materials (Basel).* 2018 May 2;11(5):714. doi: 10.3390/ma11050714. PMID: 29724045; PMCID: PMC5978091.

Luangphakdy V, Walker E, Shinohara K, Pan H, Hefferan T, Bauer TW, Stockdale L, Saini S, Dadsetan M, Runge MB, Vasanji A, Griffith L, Yaszemski M, Muschler GF. Evaluation of osteoconductive scaffolds in the canine femoral multi-defect model. *Tissue Eng Part A.* 2013

29. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science.* 1983 May 13;220(4598):680-6. doi: 10.1126/science.6403986. PMID: 6403986.

30. Lin Y, Mao C, Hou D, Chang XR, Zhang JH, Zhao XY. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2020;29(3):316-320.

31. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965 Nov 12;150(3698):893-9. doi: 10.1126/science.150.3698.893. PMID: 5319761.

32. Nar M, Staufenberg G, Yang B, Robertson L, Patel RH, Varanasi VG, D'Souza NA. Osteoconductive bio-based meshes based on poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014 May 1;38:315-24. doi: 10.1016/j.msec.2014.01.047. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24656384.

33. Arslan A, Çakmak S, Cengiz A, Gümüşderelioğlu M. Poly(butylene adipate-co-terephthalate) scaffolds: processing, structural characteristics and cellular responses. *J Biomater*

Sci Polym Ed. 2016 Dec;27(18):1841-1859. doi: 10.1080/09205063.2016.1239945. Epub 2016 Oct 10. PMID: 27724793.

34. Bi L, Zobell B, Liu X, Rahaman MN, Bonewald LF. Healing of critical-size segmental defects in rat femora using strong porous bioactive glass scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014 Sep;42:816-24. doi: 10.1016/j.msec.2014.06.022. Epub 2014 Jul 4. PMID: 25063184.

35. Ge J, Yang C, Wang Y, Zheng J, Hua H, Zhu J. Comparison of different grafting materials for treatment of bone defect distal to the molar in canine. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018 Aug;20(4):444-454. doi: 10.1111/cid.12603. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29577595.

36. Castellani C, Zanoni G, Tangl S, van Griensven M, Redl H. Biphasic calcium phosphate ceramics in small bone defects: potential influence of carrier substances and bone marrow on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Dec;20(12):1367-74. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01760.x. PMID: 20070742.

37. Arslan A, Çakmak S, Gümüşderelioğlu M. Enhanced osteogenic activity with boron-doped nanohydroxyapatite-loaded poly(butylene adipate-co-terephthalate) fibrous 3D matrix. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(sup2):790-799. doi: 10.1080/21691401.2018.1470522. Epub 2018 May 11. PMID: 29749273.

38. Balbinot GS, Leitune VCB, Ponzoni D, Collares FM. Bone healing with niobium-containing bioactive glass composition in rat femur model: A micro-CT study. *Dent Mater.* 2019 Oct;35(10):1490-1497. doi: 10.1016/j.dental.2019.07.012. Epub 2019 Aug 9. PMID: 31402134.

39. Souza L, Lopes JH, Encarnação D, et al. Comprehensive in vitro and in vivo studies of novel melt-derived Nb-substituted 45S5 bioglass reveal its enhanced bioactive properties for bone healing. *Sci Rep.* 2018;8(1):12808. Published 2018 Aug 24. doi:10.1038/s41598-018-31114-0

40. Pantulap U, Arango-Ospina M, Boccaccini AR. Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties. *J Mater Sci Mater Med.* 2021 Dec 23;33(1):3. doi: 10.1007/s10856-021-06626-3. PMID: 34940923; PMCID: PMC8702415.

41. Zhang Z, He F, Wang B, et al. Biodegradable PGA/PBAT Blends for 3D Printing: Material Performance and Periodic Minimal Surface Structures. *Polymers (Basel).* 2021;13(21):3757. Published 2021 Oct 30. doi:10.3390/polym13213757

42. Su S. Prediction of the Miscibility of PBAT/PLA Blends. *Polymers (Basel).* 2021;13(14):2339. Published 2021 Jul 16. doi:10.3390/polym13142339

43. Santana-Melo GF, Rodrigues BVM, da Silva E, Ricci R, Marciano FR, Webster TJ, Vasconcellos LMR, Lobo AO. Electrospun ultrathin PBAT/nHAp fibers influenced the in vitro and in vivo osteogenesis and improved the mechanical properties of neoformed bone. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017 Jul 1;155:544-552. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.053. Epub 2017 Apr 27. PMID: 28494433.

44. Arbez B, Kün-Darbois JD, Convert T, Guillaume B, Mercier P, Hubert L, Chappard D. Biomaterial granules used for filling bone defects constitute 3D scaffolds: porosity, microarchitecture and molecular composition analyzed by microCT and Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019 Feb;107(2):415-423. doi: 10.1002/jbm.b.34133. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29675998.
45. Subhapradha N, Abudhahir M, Aathira A, Srinivasan N, Moorthi A. Polymer coated mesoporous ceramic for drug delivery in bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2018;110:65-73. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.146
46. Ulbrich LM, Balbinot GS, Brotto GL, Leitune VCB, Soares RMD, Collares FM, Ponzoni D. 3D printing of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT)/niobium containing bioactive glasses (BAGNb) scaffolds: Characterization of composites, in vitro bioactivity, and in vivo bone repair. *J Tissue Eng Regen Med.* 2021 Dec 18. doi: 10.1002/term.3276. Epub ahead of print. PMID: 34923758.