UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao
Aparelho Locomotor

CARLA TERESA BARBOSA DE OLIVEIRA

Efeitos do selante de fibrina e fragmentos ósseos na
regeneração de defeito realizado em tíbias de ratos

Ribeirão Preto

2019

CARLA TERESA BARBOSA DE OLIVEIRA

**Efeitos do selante de fibrina e fragmentos ósseos na regeneração
de defeito realizado em tíbias de ratos**

Versão Original

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Oliveira, Carla Teresa Barbosa de
Efeitos do selante de fibrina e fragmentos ósseos
na regeneração de defeito realizado em tíbias de ratos.
Ribeirão Preto, 2019.
77 f. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Orientador: Shimano, Antônio Carlos.

1. Adesivo tecidual de fibrina. 2. Regeneração óssea.
3. Tíbia. 4. Ratos.

Nome: OLIVEIRA, Carla Teresa Barbosa de

Título: Efeitos do selante de fibrina e fragmentos ósseos na regeneração de defeito realizado em tíbias de ratos.

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Aos ratos, por doarem suas vidas aos infinitos experimentos.

À minha família, pelo apoio as minhas escolhas e incentivo a aceitar desafios.

À minha “mainha” Terezinha, minha mãe Rosa, ao meu “mano” Lyrkis, ao Lucas e ao meu “tico” Matheus por compreender a ausência e a dedicação aos estudos nesse período, amenizando a saudade de todas as formas possíveis.

À família que Ribeirão Preto me deu, Bárbara, Zido e Popô, pelo apoio emocional diário, incondicionalmente ao meu lado contribuindo da melhor forma possível: com amor, alegria e bom humor, deixando a vida sempre leve e maravilhosa.

Agradecimentos

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano, por abrir as portas da pós-graduação e ter depositado sua confiança em minha capacidade, pelo acolhimento e amizade, pelos conselhos profissionais e para a vida e pela constante preocupação com os passos futuros. Gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me encaminhar até aqui e permitir a conclusão desse desafio.

Ao Prof. Dr. José Batista Volpon, por permitir o acesso ao Laboratório de Bioengenharia e utilizar os recursos disponíveis.

Ao Prof. Dr. Marcello Henrique Nogueira-Barbosa, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor, e à secretária Rita de Cássia Stela Cossalter pela colaboração em ajudar com as burocracias necessárias.

Ao Prof. Dr. Benedito Barraviera e Prof. Dr. Rui Seabra Jr., pela cordial recepção no CEVAP e disponibilizar acesso aos seus materiais.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia, Maria Teresinha de Moraes, Ismar Ribeiro e especialmente ao Francisco Carlos Mazzocato “Chico” por estar sempre disposto a colaborar em todas as fases do experimento, sempre com bom humor e ainda, por cuidar dos animais com todo respeito e carinho.

À técnica Junia Ramos por toda paciência, disponibilidade e ajuda nas análises histológicas, do início ao fim.

Ao Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa e o técnico Dimitrius Leonardo Pitol pela colaboração e orientações quanto as análises histológicas.

À Aline de Azevedo, Mariana Maloste Butezloff e à técnica Luana Elis Sabino, pela disposição, disponibilidade e cooperação quanto as análises de micro-CT. Estendo os agradecimentos à Aline por toda paciência e colaboração quanto as análises na biologia molecular também.

Às técnicas Nilza Letícia Magalhães e Viviane de Cássia Oliveira por toda disposição em ensinar e ajudar quanto as análises da biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Fernando Chahud, à técnica Ligia e a pós-doutoranda Andressa por ter disponibilizado o acesso ao laboratório de Patologia e Medicina Legal.

Aos colegas de laboratório Jéssica, Leonardo, Patrícia, Yara e Suelen, pelo convívio e amizade, especialmente à Marcela de Paiva Britto, por toda ajuda disponibilizada nesse período.

Ao amigo Prof. Dr. Elpídio da Graça, por sempre estar ao meu lado e pelos incentivos a crescer como profissional, disposto a ajudar, orientar, aconselhar em todos os momentos.

Às amigas Bruna Carlos Leonel e Ana Clara de Oliveira pelo acolhimento, amizade, paciência e toda infinita colaboração.

À técnica Ana Paula Macedo, exemplo de profissional e ser humano, a qual adquiri imensa admiração. Agradeço pela paciência e disposição sempre que precisei, por transmitir tranquilidade quando os obstáculos apareceram, por ensinar os passos a seguir, por criar soluções quando os problemas pareciam impossíveis de resolver.

À UNAERP e aos meus queridos alunos, por me incentivarem e me desafiarem diariamente.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

“Que o ódio dê lugar ao amor, a mentira à verdade, a vingança ao perdão e a tristeza à alegria.”

Papa Francisco

Resumo

RESUMO

OLIVEIRA, C. T. B. Efeitos do selante de fibrina e fragmentos ósseos na regeneração de defeito realizado em tíbias de ratos. 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde Aplicada ao Aparelho Locomotor) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O tratamento de fraturas cominutivas requer o uso de técnicas cirúrgicas adequadas, como osteossínteses utilizando placas, parafusos e/ou pinos. Porém, estes materiais geralmente são disponíveis para fragmentos ósseos de até 1cm, exigindo técnicas alternativas para os fragmentos menores. Os adesivos ósseos podem ser chamados de cola ou selantes, embora a diferença entre eles não seja clara devido a semelhança no uso. O selante de fibrina e suas propriedades adesivas vem sendo estudado em diferentes tecidos. Além disso, previne a formação do defeito ósseo, não restringe o suprimento sanguíneo intrínseco, gera estabilidade suficiente em pequenos fragmentos ósseos ou osteocondrais e não tem necessidade de remoção cirúrgica, pois é biodegradável e biocompatível. Assim sendo, o selante de fibrina foi escolhido como objeto de estudo desta pesquisa. O objetivo foi avaliar o efeito da utilização do selante de fibrina no processo de regeneração de defeito ósseo em tíbias de ratos através de análises macroscópicas, microscópicas e mecânicas. Foram utilizados 40 ratos da raça *Rattus Norvegicus Albinus*, da variedade *Wistar*, adultos, com peso médio de $300\text{g} \pm 20\text{g}$ e idade de 10 semanas que foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=10) e avaliados em tempo único de 6 semanas (42 dias). Os grupos foram compostos por animais sem tratamento (CON), animais tratados com selante de fibrina (TSF), animais tratados com enxerto autólogo (TEA) e animais tratados com selante de fibrina e enxerto autólogo (SFEA). Um defeito ósseo foi realizado na face medial do terço proximal da tíbia utilizando uma broca trefina de 2,9mm de diâmetro, acoplado a um micromotor de baixa rotação. Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e as tíbias direita e esquerda foram dissecadas, identificadas, armazenadas e submetidas às análises de macroscopia, microtomografia computadorizada, densitometria mineral óssea, ensaio mecânico e histologia. Os resultados da análise macroscópica, densitometria óssea e força máxima foram avaliados em relação à normalidade e empregados o teste ANOVA dois fatores e

ajuste para múltiplas comparações de *Bonferroni*. Os de volume ósseo total, fração do volume ósseo total e trabéculas ósseas, espessura trabecular, número de trabéculas, espaçamento trabecular, porosidade, conteúdo mineral ósseo e rigidez relativa foram analisados com teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*. O nível de significância de 5% foi adotado para todas as comparações. Em relação ao peso das tíbias, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$). Sobre o comprimento ósseo, foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$). Os resultados obtidos por micro-CT não apresentaram diferenças significantes entre os grupos para todas as variáveis analisadas ($p>0,05$). Na densidade mineral óssea, foi possível observar diferença significativa na interação SFEA ($p=0,009$) e TSF ($p=0,007$). Em relação ao CMO, encontrou-se diferença significativa entre os grupos ($p=0,020$). Ao avaliar a Fmax, houve diferença significativa entre o grupo SFEA ($p=0,007$) e os demais. Os resultados obtidos em relação a rigidez relativa apresentam diferença significativa ($p=0,023$). Analisando os resultados de neoformação óssea, foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ($p=0,035$). Concluímos que a regeneração de defeito ósseo foi influenciada diretamente com o uso do SF e do enxerto autólogo (EA).

Palavras-Chave: Adesivo tecidual de fibrina; Regeneração óssea; Transplante autólogo; Tíbia; Ratos.

Abstract

ABSTRACT

OLIVEIRA, C. T. B. Effects of fibrin sealant and bone fragments on defect regeneration performed on rat tibias. 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The treatment of comminuted fractures requires the use of appropriate surgical techniques, such as osteosynthesis with plates, screws and/or pins. However, these materials are generally available for bone fragments up to 1cm, requiring alternative techniques for the smaller fragments. Bone adhesives may be called glue or sealants, although the difference between them is unclear due to similarity in use. Fibrin sealant and its adhesive properties have been studied in different tissues. In addition, it prevents bone defect formation, does not restrict intrinsic blood supply, generates sufficient stability in small bone or osteochondral fragments, and has no need for surgical removal as it is biodegradable and biocompatible. Therefore, fibrin sealant was chosen as the object of study for this research. The purpose was to evaluate the effect of the use of fibrin sealant in the process of bone defect regeneration in rat long bones through macroscopic, microscopic and mechanical analysis. Forty adult Wistar rats of the *Rattus Norvegicus Albinus* breed, mean weight of $300\text{g} \pm 20\text{g}$ and age of 10 weeks, were randomized into 4 groups (n=10) and evaluated at a single time of 6 weeks (42 days). The groups consisted of untreated animals (CON), treated animals with fibrin sealant (TFS), animals treated with autologous graft (TAG) and animals treated with fibrin sealant and autologous graft (FSAG). A bone defect was performed on the medial face of the proximal third of the tibia using a trephine drill of 2.9mm in diameter, coupled to a low rotation micromotor. After the experimental period, the animals were euthanized and the right and left tibia were dissected, identified, stored and submitted to the analysis of macroscopy, computerized microtomography, bone mineral densitometry, mechanical assay and histology. The data of the macroscopic analysis, bone densitometry and maximum strength were evaluated in relation to normality using the two-way ANOVA test and adjustment for multiple *Bonferroni* comparisons. The data of the micro-CT, bone mineral content and relative rigidity were analyzed with non-parametric *Kruskal-Wallis* test and *Dunn* post-test. The significance level of 5% was adopted for all comparisons. Regarding tibia weight, no statistically

significant difference was observed between the groups ($p>0.05$). On the bone length, a statistically significant difference was observed ($p=0.005$). The data obtained by micro-CT did not present significant differences between the groups for all variables analyzed ($p>0.05$). In BMD, it was possible to observe a significant difference in the FSAG interaction ($p=0.009$) and TFS ($p=0.007$). Regarding BMC, a significant difference was found between the groups ($p=0.020$). When evaluating Fmax, there was a significant difference between the FSAG variable ($p=0.007$). The results obtained related to the relative stiffness present a significant difference ($p=0.023$). Analyzing the data on bone neoformation, significant differences were found between the groups ($p=0.035$). We conclude that bone defect regeneration was directly influenced by the use of FS and autologous graft.

Keywords: Fibrin tissue adhesive; Bone regeneration; Autologous transplantation; Tibia, Rats.

Listas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma do experimento	40
Figura 2: Selante de fibrina e coágulo.....	41
Figura 3: Enxerto autólogo íntegro e fragmentado.....	41
Figura 4: A) Referência anatômica - TAT.....	42
Figura 5: A) Motor de baixa rotação B) Broca trefina de 2,9mm de diâmetro C) Defeito ósseo D) Sutura	43
Figura 6: A) Comprimento da tíbia B) Balança de precisão	44
Figura 7: Micro-CT	45
Figura 8: A) Seleção da ROI B) Visualização geral do osso	46
Figura 9: Imagens das tíbias escaneadas pelo densitômetro	47
Figura 10: Medidas realizadas para seleção da ROI sobre o defeito ósseo	47
Figura 11: Tíbia preparada para o ensaio mecânico.....	48
Figura 12: A) Bloco de parafina com tíbia exposta.....	49
Figura 13: A) Defeito ósseo corado com a técnica de tricômio de <i>Masson</i> B) Área total do defeito selecionada C) ROI selecionada D) Defeito e neoformação óssea selecionada.....	50
Figura 14: Gráfico da macroscopia das tíbias quanto o peso	52
Figura 15: Gráfico da macroscopia das tíbias quanto ao comprimento	53
Figura 16: Gráficos da microarquitetura óssea A) BV B) BV/TV C) Tb.N D) Tb.Sp E) Tb.Th F) Po.....	53
Figura 17: Gráfico da densidade mineral óssea.....	54
Figura 18: Gráfico do conteúdo mineral ósseo.....	55
Figura 19: Gráfico da força máxima.....	56
Figura 20: Gráfico da rigidez relativa	56
Figura 21: Gráfico da neoformação óssea	57

LISTA DE ABREVIações

SF	Selante de fibrina
CEVAP	Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos
UNESP	Universidade do Estado de São Paulo
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo
CON	Grupo controle
TSF	Grupo tratado com selante de fibrina
TEA	Grupo tratado com enxerto autólogo
SFEA	Grupo tratado com selante de fibrina e enxerto autólogo
EA	Enxerto autólogo
TAT	Tuberosidade anterior da tíbia
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
DMO	Densitometria mineral óssea
EM	Ensaio mecânico
Fmax	Força máxima
FOAR	Faculdade de Odontologia de Araraquara
ROI	Área de interesse
BV	Volume ósseo total
TV	Volume trabecular total
TbTh	Espessura trabecular
TbN	Número de trabéculas
TbSp	Espaçamento trabecular
Po	Porosidade
c1	Comprimento da tíbia em escala real
d1	Defeito ósseo em escala real
c2	Comprimento da tíbia na imagem escaneada

d2	Deito ósseo na imagem escaneada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
B.Ar	Área de osso
Tt.Ar	Área total de osso

LISTA DE UNIDADES

g	gramas
°C	grau Celsius
mm	milímetro
mg	miligrama
kg	kilograma
ml	mililitro
cm	centímetro
rpm	rotações por minuto
kV	quilovoltagem
μA	microampére
cm ²	centímetro quadrado
N	Newton
min	minuto
μm	micrometro

LISTA DE SÍMBOLOS

±	mais ou menos
%	porcentagem
®	marca registrada

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes do selante de fibrina utilizado.....	39
--	----

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	31
2.1	Tecido ósseo e osteogênese	31
2.1.1	Remodelação óssea	32
2.2	Regeneração óssea	32
2.2.1	Regeneração óssea indireta ou secundária	33
2.2.2	Regeneração óssea direta ou primária	33
2.2.3	Defeito ósseo.....	34
2.3	Selante de fibrina (SF).....	34
2.4	Enxerto autólogo (EA).....	35
2.5	Hipótese.....	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	Ética experimental	39
4.2	Animais experimentais.....	39
4.3	Grupos experimentais	39
4.4	Obtenção do selante de fibrina	40
4.5	Obtenção do enxerto autólogo.....	41
4.6	Procedimento cirúrgico.....	42
4.7	Eutanásia e coleta do material	43

4.8	Análise clínica.....	44
4.9	Análise macroscópica.....	44
4.10	Análise da microtomografia computadorizada	44
4.11	Análise da densidade mineral óssea	46
4.12	Ensaio mecânico de flexão em 3 pontos	48
4.13	Análise histológica	48
4.13.1	Quantificação da neoformação óssea	49
4.14	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS.....	52
5.1	Avaliação clínica.....	52
5.2	Análise macroscópica.....	52
5.3	Microtomografia computadorizada (Micro-CT)	53
5.4	Densidade mineral óssea (DMO)	54
5.5	Conteúdo mineral ósseo (CMO)	55
5.6	Força máxima (Fmax).....	55
5.7	Rigidez relativa	56
5.8	Volume ósseo neoformado.....	56
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	63
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	65
9	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXOS.....	72
	APÊNDICE.....	74

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Segundo Velloso (2005), fraturas são descritas e classificadas em grupos de acordo com o cenário do dano biológico apresentado. Entre os tipos de fraturas, existem as cominutivas, que são fraturas compostas por múltiplos fragmentos ósseos.

O tratamento de fraturas cominutivas requer o uso de técnicas cirúrgicas adequadas, como osteossínteses utilizando placas, parafusos e/ou pinos. Porém, estes materiais geralmente são disponíveis para fragmentos ósseos de até 1cm, exigindo técnicas alternativas para os fragmentos menores (WISTLICH et al., 2017). Dessa forma, os fragmentos que sobram ou os que são muito pequenos são deixados no local do defeito ósseo ou são simplesmente removidos (SONG et al., 2014).

O tratamento conservador para esse tipo de fratura, também, apresenta dificuldades como a redução e a imobilização com aparelhos gessados (LEUNG et al., 1990). Então, técnicas alternativas de fixação, como adesivos ósseos podem ser utilizadas (WISTLICH et al., 2017). Esses adesivos podem ser chamados de cola ou selantes, embora a diferença entre eles não seja clara devido a semelhança no uso (SHAH; MEISLIN, 2013).

Shah e Meislin (2013) relatam que o uso clínico de cola óssea pelos cirurgiões ortopédicos é cada vez mais comum, principalmente nas cirurgias de trauma. Atualmente, são usadas em fraturas por avulsão e fragmentos ósseos com mínima exposição de partes moles e especialmente em fraturas muito cominutivas e com fragmentos muito pequenos. Além do mais, tem sido usada para fixar fraturas periprotéticas.

Os adesivos disponíveis atualmente podem ser divididos entre sintéticos ou biológicos. O selante de fibrina (SF) e suas propriedades adesivas vem sendo estudado em diferentes tecidos (MACHADO et al., 2015). Além disso, previne a formação do defeito ósseo, não restringe o suprimento sanguíneo intrínseco, gera estabilidade suficiente em pequenos fragmentos ósseos ou osteocondrais e não tem necessidade de remoção cirúrgica (SHAH; MEISLIN, 2013), pois é biodegradável e biocompatível (PERES, 2014).

Assim sendo, o SF foi escolhido como objeto de estudo desta pesquisa para ser utilizado como adesivo em pequenos fragmentos ósseos em casos de defeitos realizados em ossos longos em tíbias de ratos.

Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tecido ósseo e osteogênese

O tecido ósseo é formado por tecido conjuntivo constituído por células e matriz extracelular. A matriz extracelular possui característica de mineralizar e concede ao osso uma importante rigidez, que permite o desempenho de funções de sustentação e proteção. A matriz de colágeno atribui ao osso uma certa maleabilidade, permitindo movimentos de flexão e extensão (JUDAS et al., 2012).

Os ossos são estruturas altamente dinâmicas que crescem, remodelam-se e mantêm-se ativos durante toda a vida do organismo (JUDAS et al., 2012). A estrutura óssea se mantém íntegra devido a proteínas e mineral e ainda, a presença de células como osteoblastos, responsáveis pela osteogênese, osteócitos que são osteoblastos maduros e que permanecem na matriz secretada, e osteoclastos, que são responsáveis pela reabsorção óssea (QUEIROZ, 2008).

Os osteoblastos são células responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, como colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas. Após realizarem a secreção de seus produtos, são envolvidos pela matriz óssea que produziram e passam a se chamar osteócitos. Os osteócitos são células essenciais na manutenção da matriz mineralizada do osso. Os osteoclastos, por sua vez, são responsáveis pela reabsorção óssea (QUEIROZ, 2008).

Todos os ossos são revestidos por membrana conjuntiva interna, conhecida como endóstio, e externa, conhecida como perióstio. Suas principais funções são promover a nutrição, crescimento e recuperação do tecido através do aporte sanguíneo (QUEIROZ, 2008).

O processo de osteogênese ocorre de forma intramembranosa ou de forma endocondral. A primeira acontece dentro de uma membrana de tecido mesenquimal e é responsável pelos ossos do esqueleto crânio-facial. A segunda acontece com a formação de um modelo em cartilagem hialina por condroblastos, com o crescimento contínuo desse molde por condrócitos, e reabsorção e substituição da cartilagem por

tecido ósseo por osteoblastos. Esta fase é responsável pela formação de ossos longos, vértebras e costelas (JUDAS et al., 2012).

O tecido ósseo pode ser do tipo cortical (compacto) ou trabecular (esponjoso). No tecido cortical, os espaços trabeculares são estreitos e a substância óssea é densa. No tecido trabecular, os espaços trabeculares são mais amplos e dispostos irregularmente, a substância óssea é formada por espículas delgadas e trabéculas que estão dispostas de acordo com as solicitações mecânicas (GUAGNELI, 2006).

2.1.1 Remodelação óssea

De acordo com Butezloff (2015), a remodelação óssea é um processo contínuo em que há deposição e reabsorção de material na estrutura óssea, tanto no osso cortical como no osso trabecular. A formação óssea ocorre em resposta a estímulos mecânicos e bioquímicos. Ambos fenômenos são fisiológicos, acoplados e dependentes, onde o predomínio de um sobre o outro pode acarretar perda ou ganho de massa óssea. Se os estímulos forem intensos e frequentes, o tecido é reforçado pela deposição de novo tecido e aumento da massa óssea, conhecido como lei de *Wolff*. Se houver excesso de carga, o tecido ósseo pode sofrer ou acumular danos estruturais que também estimulam a remodelação (JUDAS et al., 2012).

O processo de remodelação óssea não tem ligação cronológica direta com a remodelação observada em outra área qualquer (JUDAS et al., 2012).

2.2 Regeneração óssea

A regeneração óssea é um processo complexo, porém bem orquestrado, iniciado como resposta a um dano, resultando em reparo e restauração da função esquelética. Durante o processo de regeneração, as etapas do desenvolvimento embrionário acontecem e são coordenadas por diferentes tipos celulares. Todos os componentes envolvidos no dano contribuem com o processo de reparo como a cortical, o periósteo, a medula óssea e os tecidos moles (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

Histologicamente, a regeneração óssea é dividida em direta ou primária e indireta ou secundária, por isto nas próximas sessões estes dois fenômenos serão descritos.

2.2.1 Regeneração óssea indireta ou secundária

Regeneração indireta ou secundária envolve a maioria dos reparos ósseos. Esse processo melhora com micromovimentos e é inibido com fixação rígida (TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007).

Há uma fase inicial anabólica caracterizada por um aumento de volume de tecido relacionado ao recrutamento e diferenciação de células tronco, que formam tecido ósseo e vascular. Imediatamente adjacente a linha de fratura, um calo cartilaginoso é formado e nas periferias do tecido ósseo cartilaginoso, o periósteo inicia o processo de formação óssea (EINHORN; GERSTENFELD, 2015).

A fase anabólica é seguida por uma nova e prolongada fase em que as atividades catabólicas são predominantes e caracterizada pela diminuição do volume do calo ósseo. A cartilagem é reabsorvida e iniciada a formação óssea secundária. Quando a fase de remodelamento inicia, o calo ósseo primário e secundário são reabsorvidos e o tecido adquire sua estrutura original. Nesse período, o canal medular é reestabilizado e a estrutura da medula óssea e do osso são regenerados (EINHORN; GERSTENFELD, 2015).

2.2.2 Regeneração óssea direta ou primária

Regeneração direta ou primária ocorre quando a fratura é reduzida anatomicamente com fixação interna rígida, reduzindo a tensão entre fragmentos com objetivo de reestabelecer os canais de *Havers*. Durante esse processo, há pouca ou nenhuma resposta periosteal como formação de calo ósseo (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

2.2.3 Defeito ósseo

Um defeito ósseo experimental deve ser grande o suficiente para que não ocorra reparo espontâneo, pois somente nessa situação o potencial osteogênico do implante, enxerto ou medicamento pode ser considerado real (PRADO et al., 2006). Um defeito ósseo crítico foi então definido por Cooper et al. (2010) como o menor defeito intraósseo que não irá cicatrizar espontaneamente durante a vida do animal. Entretanto, devido a duração limitada dos estudos, Prado et al., 2006 definiram que defeito de tamanho crítico é aquele que não sofre reparo no período de duração do experimento. O reparo de defeitos ósseos é muito similar ao reparo primário ou direto de fraturas, entretanto são menos sujeitos a fatores mecânicos e a obstruções do aporte sanguíneo.

2.3 Selante de fibrina (SF)

O SF é um biomaterial que apresenta propriedades hemostática e reparadora. Ele tem sido utilizado com sucesso como arcabouço (*scaffolds*) e adesivos para melhorar o reparo e regeneração de tecidos (BARROS et al., 2016).

O SF é um derivado de uma enzima obtida do veneno de cobra (*Crotalus Durissus Terrificus*) e do fibrinogênio extraído de sangue de animal de grande porte (por exemplo, o búfalo) (IATECOLA et al., 2013). Essa ideia surgiu no final de 1980, de um grupo de pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), em Botucatu (THOMAZINI-SANTOS et al., 2001).

Conforme Barros et al. (2016), o SF têm duas funções principais: a primeira como carreador para a matriz extracelular e suporte na administração de medicamentos; e a segunda como acelerador no reparo de feridas e lesões, diminuindo as chances de sangramento e protegendo a área contra agentes bacterianos.

Bosch et al. (1977) utilizaram uma mistura de adesivos de fibrina e fragmentos ósseos na cirurgia ortopédica. Entretanto, até hoje não há descrição de produtos que colam ossos, apesar da quantidade de trabalhos em adesivos de tecidos e ossos, é

evidente que o desenvolvimento de um sucesso está em seus estágios iniciais (HEISS et al., 2006).

Estudos adicionais estão sendo realizados com resultados encorajadores, tornando o SF uma nova opção de tratamento que não utiliza sangue humano, apresenta boa capacidade adesiva e tem baixo custo (THOMAZINI-SANTOS et al., 2001).

2.4 Enxerto autólogo (EA)

EA são tecidos ósseos retirados e usados no mesmo indivíduo. Respeitando seus limites técnicos, os EA podem ser usados para reconstruir todas as características de um defeito ósseo em termos de volume, estrutura, resistência, forma e aceitação de implantes osteointegrados (TESSIER et al., 2005).

Segundo Guskuma et al. (2010), osso autólogo é padrão ouro para o preenchimento de defeitos causados por doenças ou traumas. As propriedades de osteoindução e osteocondução, biocompatibilidade e a impossibilidade de transmitir doenças são as características diferenciais das altas de sucesso do osso autólogo.

2.5 Hipótese

H1: O selante de fibrina auxilia no processo de regeneração de defeitos ósseos em tíbias de ratos.

H0: O selante de fibrina não auxilia no processo de regeneração de defeitos ósseos em tíbias de ratos.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da utilização do selante de fibrina no processo de regeneração de defeito realizado em tíbias de ratos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do selante de fibrina na regeneração óssea por meio de análises macroscópicas, microscópicas e mecânicas.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética experimental

Este trabalho seguiu as normas descritas pelo Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório (NEVES et al., 2013) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), registrado com o nº 097/2017.

4.2 Animais experimentais

Foram utilizados 40 ratos da raça *Rattus Norvegicus Albinus*, da variedade *Wistar*, com peso médio de $300\text{g} \pm 20\text{g}$ e idade de 10 semanas. Esses animais foram fornecidos pelo Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da USP. Foram alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP, mantidos em caixas específicas em ambiente calmo, em condições controlada com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade de $55\% \pm 10$ e luminosidade com ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Eles foram alimentados com ração padrão para ratos e água fornecidas *ad libitum*.

Ao serem recebidos no Biotério do Laboratório de Bioengenharia, os animais foram identificados por meio de marcações numéricas na cauda feitas com caneta para marcação cirúrgica, modelo z100 e foram pesados semanalmente. Os ratos foram mantidos em caixas coletivas com 5 animais cada, por 7 dias para adaptação ao ambiente. Após procedimento cirúrgico, os animais foram alojados em caixas com 2 ou 3 ratos para melhor acompanhamento do período pós-operatório.

4.3 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos ($n=10$) e avaliados em tempo único de 6 semanas (42 dias). Em todos os animais, um defeito ósseo de 2,9mm de diâmetro foi realizado na face medial do terço proximal das tíbias direita e

esquerda. Os grupos foram compostos por animais sem tratamento (CON), animais tratados com selante de fibrina (TSF), animais tratados com fragmentos ósseos como enxerto autólogo (TEA) e animais tratados com selante de fibrina e enxerto autólogo (SFEA), como segue na Figura 1.

Figura 1: Fluxograma dos grupos experimentais

Fonte: Arquivo próprio

4.4 Obtenção do selante de fibrina

O SF utilizado neste estudo foi produzido pelo CEVAP (ABBADE et al., 2015; BARROS et al., 2009) e cedido pelos professores Dr. Benedito Barraviera e Dr. Rui Seabra Jr.

Tabela 1. Componentes do selante de fibrina utilizado

COMPONENTES	SOLUÇÃO
Serina protease 0,4ml	Fração I – frasco vermelho
Criopreciptado de fibrinogênio 1ml	Fração II – frasco preto
Cloreto de cálcio 0,6ml	Diluyente – frasco branco

Fonte: Abbade et al. (2015)

O produto, fracionado em frascos, foi mantido em freezer a -20°C e no momento do uso, os componentes foram previamente descongelados em temperatura ambiente e reconstituídos, misturados e aplicados originando um coágulo (Figura 2). Para o grupo TSF, foram utilizadas 0,25ml (5 gotas) de cada fração para a formação do coágulo e para o grupo SFEA, foram utilizadas 0,20ml (4 gotas) de cada fração.

Figura 2: Selante de fibrina e coágulo

Fonte: Arquivo próprio

4.5 Obtenção do enxerto autólogo

O EA utilizado nos grupos TEA e SFEA foi coletado no momento da realização do defeito com a broca trefina de 2,9mm de diâmetro. O osso retirado foi fragmentado em 4 partes de tamanho similar com o auxílio de um osteótomo (Figura 3). No grupo TEA, os fragmentos foram devolvidos ao defeito individualmente. No grupo SFEA, os fragmentos foram incluídos no coágulo formado pelo SF e então, devolvidos ao defeito.

Figura 3: Enxerto autólogo íntegro e fragmentado

Fonte: Arquivo próprio

4.6 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado em todos os animais experimentais utilizando materiais estéreis. Os animais foram pesados previamente para fins de cálculos da dosagem e acompanhamento pós-cirúrgico. Para a anestesia, foi utilizado uma solução composta por Ketamina (75-100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), aplicada via intramuscular na região glútea. Em seguida, a tricotomia foi realizada em ambos os membros pélvicos com máquina elétrica. A assepsia foi realizada com iodo. Uma dose de 0,1ml de pentabiótico foi administrada via intramuscular em seguida.

Os animais foram posicionados em supino, com membros em rotação externa e em tríplex flexão. A tuberosidade anterior da tíbia (TAT) foi a referência anatômica utilizada para a realização da incisão na face medial da região proximal da tíbia (Figura 4A e 4B). A incisão foi realizada em padrão linear, na pele e musculatura, com aproximadamente 1cm de extensão utilizando lâmina de bisturi número 15. A pele e músculos foram afastados para expor a superfície óssea.

Figura 4: A) Referência anatômica - TAT
B) Incisão na face medial da região proximal da tíbia

Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

O defeito ósseo foi realizado na face medial do terço proximal da tíbia utilizando uma broca trefina de 2,9mm de diâmetro, acoplado a um micromotor de baixa rotação (Figura 5A), modelo 210/105L, marca Strong® ajustado em

aproximadamente 3000 rotações por minuto (rpm). Foi realizada irrigação contínua com solução fisiológica estéril para evitar o superaquecimento local (Figura 5B). O osso foi removido, criando um defeito ósseo unicortical (Figura 5C). Cada grupo recebeu a conduta programada.

Figura 5: A) Motor de baixa rotação B) Broca trefina de 2,9mm de diâmetro
C) Defeito ósseo D) Sutura

Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

A musculatura foi suturada com fio absorvível Vicryl 4.0 e a pele com fio não absorvível Nylon 3.0 (Figura 5D).

Após procedimento cirúrgico, os animais permaneceram em caixas com 2 ou 3 ratos e foram observados até o final do período experimental. Até o segundo dia de pós-operatório, foi administrada uma dose de dipirona (2,5g/kg) a cada 12 horas via subcutânea para analgesia.

4.7 Eutanásia e coleta do material

Após o período experimental de 42 dias, os animais foram submetidos à eutanásia com doses excessivas de Xilazina e Ketamina. As tíbias esquerda e direita foram dissecadas, identificadas e armazenadas seguindo o protocolo específico para cada análise.

Cada grupo totalizou 20 tíbias que foram divididas de acordo com as análises que foram destinadas. Todas as tíbias direitas foram congeladas em freezer a -20°C e destinadas para as análises macroscópica, microtomografia computadorizada (micro-CT), densitometria mineral óssea (DMO) e ensaio mecânico (EM). Em relação

as tíbias esquerdas, 5 foram imediatamente armazenadas em formol 10% e destinadas à análise histológica e 5 foram congeladas em freezer a -70°C para fins de reserva de material.

4.8 Análise clínica

Os animais foram analisados clinicamente durante todo o período experimental com relação ao estado geral, inspeção dos membros pélvicos e movimentação espontânea, aspecto da região periorbitária e focinho, pelagem, alimentação e semanalmente, avaliados em relação a massa corpórea.

4.9 Análise macroscópica

O comprimento das tíbias e a distância entre a extremidade proximal e o defeito ósseo foram medidos com paquímetro da marca Mitutoyo® com precisão de 0,01mm (Figura 6A) e o peso foi medido em balança de precisão da marca Marte®, modelo AC-2000 com precisão de 0,01g (Figura 6B).

Figura 6: A) Comprimento da tíbia B) Balança de precisão

A

B

Fonte: A) Banco de imagens do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto B) Marte

4.10 Análise da microtomografia computadorizada

A análise microtomográfica foi realizada em 5 tíbias direita de cada grupo, por um microtomógrafo, marca Bruker®, modelo Skyscan 1176, (Figura 7), pertencente ao Laboratório de Microtomografia *in vivo* da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAR-UNESP). Os ossos foram colocados em um suporte de isopor tubular e fixados de maneira padronizada na sela do equipamento. Os ossos foram escaneados com um filtro de alumínio de 1mm de espessura, com voltagem e amperagem, respectivamente de 65kV e 318 μ A.

Figura 7: Micro-CT

Fonte: Bruker

As reconstruções de imagens 3D foram feitas usando o *software* NRecon® (versão 1.6.9.8), com o objetivo de determinar parâmetros e reduzir artefatos. As imagens foram redirecionadas ao *software* Data Viewer® (versão 1.5.0.2) e salvas nos planos coronal, axial e sagital. Com o *software* CTAn® (versão 1.13.11.0), selecionando o defeito ósseo como área de interesse (ROI), foi possível analisar os parâmetros de volume ósseo total (BV), fração do volume ósseo total e trabéculas ósseas (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), espaçamento trabecular (Tb.Sp) e porosidade (Po). O *software* CTVol® (versão 2.2.3.0) foi utilizado para confecção de imagens em 3D (Figura 8).

Figura 8: A) Seleção da ROI B) Visualização geral do osso

Fonte: A) Banco de imagens do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

4.11 Análise da densidade mineral óssea

A análise densitométrica foi realizada em 10 tíbias direita de cada grupo por um densitômetro de dupla emissão de raios X, Lunar®, modelo DPX-IQ, pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. Os ossos foram alinhados em um recipiente de plástico com a face medial para cima, imersos sob profundidade de 2cm de água. Foram escaneados com um *software* de alta resolução DPX (versão 4.7e especial para pequenas amostras) Um ROI com área padronizada de 0,074cm² foi posicionado sobre a região do defeito ósseo (Figura 9).

Figura 9: Imagens das tíbias escaneadas pelo densitômetro

Fonte: A) Banco de imagens do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Para certificar se o posicionamento da ROI estava sobre o defeito ósseo, o comprimento da tíbia, a distância entre a extremidade proximal e o defeito ósseo foram utilizados para transpor a escala real para a imagem escaneada no *software* (Figura 10).

Dessa forma:

c1 corresponde ao comprimento medido diretamente na tíbia

d1 corresponde ao defeito ósseo medido diretamente na tíbia

c2 corresponde ao comprimento medido na imagem escaneada da tíbia

d2 corresponde ao defeito ósseo medido na imagem escaneada da tíbia

Figura 10: Medidas realizadas para seleção da ROI sobre o defeito ósseo

Fonte: A) Banco de imagens do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

4.12 Ensaio mecânico de flexão em 3 pontos

O EM foi realizado nas 10 tíbias direitas de cada grupo experimental após a DMO em Máquina Universal de Ensaio, marca EMIC®, modelo DL10000, pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. Foi realizado ensaio em flexão de 3 pontos com uma célula de carga com capacidade de 500N, com pré-carga de 5N. A região distal dos ossos foi previamente incluída em resina, para obter melhor ajuste na fixação no acessório de ensaio. O osso foi apoiado na região do defeito ósseo e na região proximal, com distância de 10mm entre eles (Figura 11). A carga foi aplicada em sentido pósterio-anterior da tíbia e com velocidade de aplicação da carga padronizada em 5mm/min. O *software* Tesc® foi utilizado para a geração de um gráfico de carga *versus* deslocamento, sendo analisadas a força máxima (Fmax) e a rigidez relativa.

Figura 11: Tíbia preparada para o ensaio mecânico

Fonte: A) Banco de imagens do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

4.13 Análise histológica

Ao completar 24h em formol 10%, os ossos foram descalcificados em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10% por 30 dias em temperatura ambiente, realizando trocas de solução a cada 2 dias.

Após esse período, os ossos foram lavados em água corrente *overnight* e desidratados em concentração crescente de álcool de 70% a 100%, permanecendo 1 hora em cada. Em seguida, os materiais foram diafanizados em xilol em 3 trocas com intervalo de 1 hora cada. Sucessivamente, o terço distal da tíbia foi cortado e excluído.

Os ossos foram posicionados em blocos de parafina com a face medial exposta para cortes (Figura 12A E 12B).

Figura 12: A) Bloco de parafina com tíbia exposta
B) Posicionamento da tíbia no bloco de parafina

Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Os blocos foram seccionados em cortes longitudinais, sequenciais, de 5µm de espessura. Os materiais contendo a região do defeito foram capturados em lâminas de vidro com polilisina, sendo posicionados 4 cortes por lâmina. Foram obtidas 20 lâminas de cada amostra, onde as 10 ímpares foram coradas pela técnica de tricrômio de *Masson*, totalizando 40 cortes.

Para a análise das lâminas, foi utilizado o microscópio óptico Zeiss®, modelo Axio Vert. A1 acoplado a uma câmera digital Zeiss®, modelo AxioCam MRc pertencente ao Laboratório de Metrologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da USP.

4.13.1 Quantificação da neoformação óssea

Nas lâminas coradas em tricômio de *Masson* (Figura 13A) foram avaliadas as áreas de neoformação óssea na objetiva de 5x através do *software* NIS-Elements BR® (versão 3.0 SP1). A área do defeito foi demarcada como ROI, sendo calculado o volume total (Figura 13B). Posteriormente, a área correspondente a osso trabecular

foi demarcada como ROI (Figura 13C), sendo calculado o volume correspondente (Figura 13D). A quantificação foi expressa pela razão da área de osso pela área total (B.Ar/Tt.Ar $\times$ 100 - %).

Figura 13: A) Defeito ósseo corado com a técnica de tricômio de *Masson*
B) Área total do defeito selecionada C) ROI selecionada D) Defeito e neoformação óssea selecionada

Fonte: Arquivo pessoal

4.14 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o *software* SPSS® (versão 20.0) sendo adotado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Todos os dados foram testados quanto a normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk.

Para os dados de peso, comprimento, DMO e Fmax foi empregado o teste de ANOVA dois fatores e ajuste para múltiplas comparações de *Bonferroni*.

Os dados de CMO, rigidez relativa e dados obtidos por meio do micro-CT foram avaliados por teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*.

A influência das variáveis SF e EA, bem como a interação SF e EA sobre os dados foram avaliadas.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica

Durante a realização do experimento, foram utilizados 5 ratos a mais para repor os que tiveram complicações incomuns. As complicações dos 5 (11%) animais durante o período pós-operatório resultaram em suas exclusões: um (2%) animal do grupo SFEA evoluiu com a inutilização de um membro pélvico, deambulando em carga zero, 2 (4%) animais, um do grupo SFEA e outro do grupo TSF, apresentaram deformidade em um dos membros pélvicos e 2 (4%) animais do grupo TEA apresentaram quadro diarreico com perda ponderal progressiva. Portanto, foi utilizado um total de 40 ratos para os procedimentos cirúrgicos.

Entretanto, não foram observados sinais de estresse, assim como sinais de infecção da ferida operatória ou deiscência de sutura.

5.2 Análise macroscópica

A análise macroscópica das amostras permitiu avaliar o comprimento e a massa óssea das tíbias. Em relação à massa das tíbias (Figura 14), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Sobre o comprimento ósseo (Figura 15), foi observada diferença estatisticamente significativa para o uso do SF ($p=0,005$). Os grupos com SF apresentaram maior comprimento.

Figura 14: Gráfico da macroscopia das tíbias quanto o peso

Figura 15: Gráfico da macroscopia das tíbias quanto ao comprimento

5.3 Microtomografia computadorizada (Micro-CT)

Os dados obtidos por micro-CT não apresentaram diferenças significantes entre os grupos para todas as variáveis analisadas que são: Bv, Bv/Tv, Tb.N, Tb.Sp, Tb.Th e Po, como mostra a Figura 16. Entretanto, em se tratando de números absolutos, os grupos tratados com SF tendem a apresentar melhores resultados quando comparados com os demais grupos.

Figura 16: Gráficos da microarquitetura óssea
A) Bv B) Bv/TV C) Tb.N D) Tb.Sp E) Tb.Th F) Po

5.4 Densidade mineral óssea (DMO)

Ao comparar os efeitos das variáveis na DMO (Figura 17), não foi possível observar diferença significativa para o uso de SF ($p=0,213$) e o uso de EA ($p=0,190$). Porém, a interação SF e EA foram significantes ($p=0,009$). Para os animais sem o uso de EA, os animais sem SF apresentaram menores valores que os animais com SF ($p=0,007$); para os animais com EA não há diferença entre com e sem EA ($p=0,326$); para os animais com SF, os animais sem EA apresentaram maiores valores que os animais com EA ($p=0,007$).

Figura 17: Gráfico da densidade mineral óssea

5.5 Conteúdo mineral ósseo (CMO)

Em relação ao CMO (Figura 18), encontrou-se diferença significativa ($p=0,020$) entre os grupos, sendo que os animais do grupo TSF apresentaram CMO significativamente maior que os grupos SFEA ($p=0,044$) e CON ($p=0,035$). Porém sem diferença significativa em comparação com o grupo TEA.

Figura 18: Gráfico do conteúdo mineral ósseo

5.6 Força máxima (Fmax)

Ao avaliar a Fmax das amostras (Figura 19), não se observou diferença significativa para o uso de SF ($p=0,312$) e do enxerto ósseo ($p=0,233$). Em relação a interação entre SF e EA, diferença foi significativa ($p=0,007$). Para os animais sem EA, não há diferença entre aplicar ou não o SF ($p=0,304$); para os animais com EA, os animais sem SF apresentaram maiores valores que os animais com SF ($p=0,009$). Para os animais sem SF, os animais sem EA apresentaram menores valores que os animais com EA ($p=0,007$); para os animais com SF, não há diferença entre utilizar ou não o EA ($p=0,254$).

Figura 19: Gráfico da força máxima

5.7 Rigidez relativa

Os resultados obtidos em relação à rigidez relativa (Figura 20) apresentam diferença significativa ($p=0,023$) em que a variável TEA foi maior que CON ($p=0,017$), ou seja, os defeitos tratados com EA apresentaram maior rigidez que os sem nenhum tratamento.

Figura 20: Gráfico da rigidez relativa

5.8 Volume ósseo neoformado

Analisando os dados de neoformação óssea (Figura 21), foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ($p=0,035$). O grupo CON apresentou volume

ósseo neoformado significativamente melhor quando comparado ao grupo ao grupo TEA ($p=0,049$), assim o uso do EA isolado resultou em aumento da neoformação óssea na região do defeito.

Figura 21: Gráfico da neoformação óssea

Discussão

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas do século 21, com o aumento de traumas de alta energia, houve o aumento de fraturas cominutivas (SHIMABUKURO et al., 1997). O tratamento dessas fraturas requer técnicas alternativas, visto que atualmente, placas e parafusos estão disponíveis para fragmentos de até 1cm (WISTLICH et al., 2017). O desejo de cirurgias ortopédicas por tais técnicas levou ao desenvolvimento de uma variedade de substitutos biológicos e sintéticos, como a cola óssea (HEISS et al., 2006).

Uma cola proporcionaria um método simples e rápido de fixar fraturas, principalmente as cominutivas, em que há dificuldades de fixação por métodos tradicionais. Também seria de grande valor em fraturas articulares, onde implantes podem interferir na articulação assim como na pré-montagem dos fragmentos, antes da colocação das sínteses metálicas. Além disso, por ser um material bioabsorvível, não haveria necessidade de remover o implante (FARRAR, 2012).

Segundo Gasparotto (2012) e Da Cunha et al. (2015), o SF é considerado um adesivo biológico obtido da serpente cascavel e fibrinogênio de grandes animais. É um produto novo, biodegradável, com boa capacidade adesiva e não transmite doenças infecciosas. Além do mais, o fato ser produzido no CEVAP/UNESP-Botucatu e sua tecnologia ser totalmente nacional, reduz os custos de produção (CASTRO, 2015). Por esses motivos, o SF foi escolhido como objeto de estudo desta pesquisa.

De acordo com Prado et al. (2006), para avaliar a regeneração óssea, defeitos ósseos são opção em experimentos pois estão menos expostos a fatores mecânicos e obstruções do aporte sanguíneo se comparados com o reparo ósseo em fraturas. Schmitz e Hollinger (1986) definiram que um defeito ósseo experimental é aquele que não sofre reparo no período de duração do estudo.

Prado et al. (2006) testaram defeitos entre 2 e 3,5mm entre 15 e 45 dias não visualizando fechamento em nenhum deles. Concluíram, então, que devido a semelhança dos reparos, o pesquisador pode escolher o tamanho e o tempo adequado para a pesquisa. Porém, a definição de defeito ósseo crítico ainda é controversa na literatura. Honma et al. (2008) compararam defeito ósseo de 3,8mm e 8,8mm em 24 semanas, observando o reparo quase completo do menor defeito.

Levando em consideração equitativamente esses dados, optou-se pelo defeito ósseo de 2,9mm e tempo experimental de 42 dias.

Ainda de acordo com Prado et al. (2006), os defeitos ósseos devem ser realizados distantes da região epifisária, evitando tecido cartilaginoso, tecido predominantemente esponjoso e complicações como fraturas. Por tal motivo, optamos por realizar o defeito ósseo na região meta-diafisária da região proximal da tíbia.

O enxerto autólogo (EA) apresenta propriedades de osteoindução e osteocondução, biocompatibilidade e não transmite doenças, tornando esse tipo de enxerto o padrão ouro no preenchimento de defeitos causados por doenças ou traumas (GUSKUMA et al., 2010). Diante dessa informação, optou-se por utilizar o osso retirado do próprio animal como enxerto, porém de forma fragmentada.

Para esse experimento, animais fêmeas foram excluídas com o objetivo de minimizar influências hormonais da mesma maneira que animais jovens, devido a neoformação óssea ser mais dinâmica (DE CARVALHO, 2010). Com essa justificativa, optamos por ratos machos e adultos.

Augat et al. (2014) avaliaram a biomecânica do reparo de fraturas. Segundo os autores, a capacidade de suporte de peso de um osso está diretamente relacionada ao progresso do reparo de uma fratura. Esse achado serviu de estímulo na escolha da tíbia, um osso longo e de carga, ao invés da calvária, comumente usada no meio acadêmico para avaliar regeneração óssea.

Durante o ato cirúrgico, ao unir os componentes do SF com o EA, percebemos que o coágulo formado é resistente o suficiente para manter os fragmentos ósseos unidos, dificultando a dispersão do mesmo no sítio cirúrgico. Reforçando nossa impressão, o estudo de Rezende et al. (2014) afirmam que o adesivo tecidual de fibrina tem sido usado como carreador para a entrega de medicamentos ou outros materiais biológico devido as suas propriedades hemostáticas, biocompatibilidade e absorção como parte do processo reparador. Além do mais, facilmente o coágulo adquire formatos diferentes, podendo ser usado em ambientes distintos.

Em relação à cicatriz cirúrgica, durante o exame macroscópico não foi identificada sinais de reação inflamatória durante todo o período pós-operatório até a eutanásia dos animais. Assim como latecola et al. (2013), Da Cunha et al. (2015) também notaram a ausência macroscópica, radiológica e histológica de processos inflamatórios, que caracterizam rejeição imunológica a este biomaterial.

A análise macroscópica relacionada ao comprimento das tíbias apresentou maior tamanho em grupos que receberam o SF como tratamento. Podemos associar esses resultados com o peso dos animais, pois em se tratando de valores absolutos, os grupos SF e SFEA apresentam maior peso ósseo se comparados com o grupo EA.

Em relação ao peso ósseo, não houve diferença significativa entre os grupos. Esse dado pode ser justificado com os achados durante as avaliações clínicas pós-operatórias, onde os animais não demonstraram queda do estado geral, alterações nos membros pélvicos, sinais físicos de estresse e anorexia.

Os resultados obtidos na DMO e na micro-CT apresentaram diferenças entre os grupos e esses dados retratam maior influência do SF na regeneração óssea. Contudo, os valores de BV, BV/TV, Tb.N, Tb.Sp, Tb.Th e Po não foram estatisticamente significantes, mas os valores absolutos tendem a inferir que o grupo TSF sofreu maior influência em sua cicatrização. Em contrapartida, os valores da DMO mostram significância na interação do grupo SFEA e um maior valor referente ao grupo TSF. Do mesmo modo, Da Cunha et al. (2015) observaram a proliferação de células osteoprogenitoras formando osso trabeculado após 4 semanas de implantação do biomaterial associado ao SF e concluíram que o SF apresentou osteocondutividade durante o reparo ósseo e proporcionou maior estímulo osteogênico ao ser combinado com biomaterial.

Agregando dados favoráveis ao SF, as análises do CMO mostram valores de maior significância ao grupo TSF também.

Em relação aos resultados do EM e neoformação óssea, os grupos TEA apresentaram maior índice de influência na cicatrização. Para reforçar esse resultado, Pintar et al. (1994) realizaram um experimento comparando EA e hidroxiapatita em defeito ósseo na coluna cervical de cabras. O EM demonstrou rigidez similar entre as amostras, assim como a histologia demonstrou neoformação óssea no tratamento com ambos os materiais. Esses dados podem ser relacionados aos resultados do nosso estudo, em que o grupo tratado com fragmentos ósseos do próprio animal resultou em maior rigidez, necessitou de maior força para sofrer deformação e apresentou maior formação na quantidade de células do tecido ósseo.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, conclui-se que, a utilização do SF em defeitos ósseos em tíbias de ratos estimulou o crescimento ósseo, aumentou a densidade e o conteúdo mineral ósseo, bem como aumentou o volume ósseo com formação de maior quantidade de trabéculas com maior espessura das mesmas. Com interação do EA, o defeito ósseo torna-se mais rígido, necessitando de uma força maior para alcançar a deformidade além de aumentar a quantidade de neoformação óssea. Desta maneira, pode-se deduzir que a regeneração de defeito ósseo foi influenciada diretamente com o uso do SF e do EA.

Sugestões para trabalhos futuros

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar modelos de experimentos com fraturas ósseas bicorticais;

Analisar amostras em tempos de tratamento diferentes;

Aumentar o número de amostras para obter valores estatisticamente significantes;

Utilizar diferentes tipos de enxertos;

Realizar análises da biologia molecular e mais análises histomorfométricas.

Referências

9 REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. P. F. et al. A new fibrin sealant derived from snake venom candidate to treat chronic venous ulcers. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 5, p. AB271, maio 2015.
- AUGAT, P. et al. Biomechanical methods for the assessment of fracture repair. **Injury**, v. 45, n. S2, p. S32–S38, jun. 2014.
- BARROS, C. N. DE et al. A new heterologous fibrin sealant as a scaffold to cartilage repair — Experimental study and preliminary results. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 13, p. 1410–1415, 2016.
- BARROS, L. C. et al. A new fibrin sealant from crotalus durissus terrificus venom: Applications in medicine. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 12, n. 8, p. 553–571, 2009.
- BOSCH, P. et al. Die Beeinflussung der Knochenheilung durch hochkonzentriertes Fibrin. **Archiv fur orthopadische und Unfall-Chirurgie**, v. 273, n. 89, p. 259–273, 1977.
- BUTEZLOFF, M. M. **Consolidação óssea após fratura diafisária do fêmur em ratas com e sem osteoporose, e tratadas com terapia por vibração**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.
- CASTRO, M. V. **Estudo comparativo do emprego de selante de fibrina comercial e derivado do veneno de cascavel para reimplante de raízes ventrais medulares após avulsão**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2015.
- COOPER, G. M. et al. Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD). **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 125, n. 6, p. 1685–1692, 2010.
- DA CUNHA, M. R. et al. Hydroxyapatite and a new fibrin sealant derived from snake venom as scaffold to treatment of cranial defects in rats. **Materials Research**, v. 18, n. 1, p. 196–203, 2015.
- DE CARVALHO, A. C. A. **Reparo ósseo de defeito crítico em calvária de rato com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina**. [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2010.
- DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular

aspects of bone healing. **Injury**, v. 36, n. 12, p. 1392–1404, 2005.

EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: Mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 45–54, 2015.

FARRAR, D. F. Bone adhesives for trauma surgery: A review of challenges and developments. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 33, p. 89–97, 2012.

GASPAROTTO, V. P. DE O. **Avaliação da viabilidade do selante de fibrina derivado de veneno de serpente como arcabouço biológico para células tronco mesenquimais de medula óssea de ratos**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2012.

GUAGNELI, R. S. **Propriedades mecânicas do osso esponjoso e cortical do rato, após período de imobilização por aparelho gessado ou suspensão pela cauda**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.

GUSKUMA, M. H. et al. Bone regeneration in surgically created defects filled with autogenous bone: an epifluorescence microscopy analysis in rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 18, n. 4, p. 346–353, 2010.

HEISS, C. et al. Bone adhesives in trauma and orthopedic surgery. **European Journal of Trauma**, v. 32, n. 2, p. 141–148, 2006.

HONMA, T. et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. **Oral Diseases**, v. 14, n. 5, p. 457–464, jul. 2008.

IATECOLA, A. et al. Use of a new fibrin sealant and laser irradiation in the repair of skull defects in rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 5, p. 456–461, 2013.

JUDAS, F. et al. **Estrutura e dinâmica do tecido ósseo**. [s.l.] Universidade de Coimbra, 2012.

LEUNG, K. S. et al. An effective treatment of comminuted fractures of the distal radius. **Journal of Hand Surgery**, v. 15, n. 1, p. 11–17, 1990.

MACHADO, E. G. et al. A new heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 3, p. 288–296, 2015.

NEVES, S. M. P. et al. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: [s.n.].

PERES, V. S. [UNESP]. **Efeito do selante de fibrina derivado de peçonha de serpente associado a células-tronco mesenquimais na cicatrização de ferida cirúrgica em ratos.** [s.l: s.n.].

PINTAR, F. A. et al. Fusion rate and biomechanical stiffness of hydroxylapatite versus autogenous bone grafts for anterior discectomy. **Spine**, v. 19, n. 22, p. 2524–2528, 1994.

PRADO, F. DE A. et al. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 18, n. 1, p. 7–13, 2006.

QUEIROZ, A. M. P. **O uso de membrana de látex natural como membrana oclusiva associada ao laser de baixa intensidade em regeneração óssea.** [s.l.] Universidade do Sagrado Coração, 2008.

REZENDE, M. C. R. A. et al. Adesivo tecidual de fibrina e sua aplicação na implantodontia. **Archives of Health Investigation**, v. 3, n. 6, p. 55–60, 2014.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 205, p. 299–308, 1986.

SHAH, N. V; MEISLIN, R. Current state and use of biological adhesives in orthopedic surgery. **Orthopedics**, v. 36, n. 12, p. 945–956, 2013.

SHIMABUKURO, E. H. et al. Estudo comparativo entre o emprego da placa-ponte e da haste intramedular bloqueada nas fraturas diafisárias cominutivas do fêmur. **Revista de Ciências Médicas**, v. 6, n. 4, p. 13–22, 1997.

SONG, S. H. et al. Fixation of fractured anterior wall of maxillary sinus using fibrin glue in a zygomaticomaxillary complex fracture. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 25, n. 3, p. 919–921, 2014.

TESSIER, P. et al. Autogenous bone grafts and bone substitutes - Tools and techniques: I. A 20,000 - Case experience in maxillofacial and craniofacial surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 116, n. 5, p. 6–24, 2005.

THOMAZINI-SANTOS, I. A. et al. Surgical adhesives. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 2, p. 1–7, 2001.

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules? **Injury**, v. 38, n. S1, p. S11–S25, 2007.

VELLOSO, G. R. Fraturas: origem e tratamentos. **Universitas: Ciências da Saúde**,

v. 3, n. 2, p. 297–301, 1 abr. 2005.

WISTLICH, L. et al. A bone glue with sustained adhesion under wet conditions.

Advanced Healthcare Mater, v. 6, p. 1–11, 2017.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeitos do selante de fibrina e fragmentos ósseo na regeneração de defeito realizado em tibia de rato*”, registrado com o número **097/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 25 de setembro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 56 ratos Wistar-Old machos pesando 300g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 25/09/2017 a 15/01/2019.

We certify that the Protocol *n° 097/2017*, entitled “*Effects of fibrin sealant and bone fragments on the regeneration of defect performed on rat's tibia*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *09/25/2017*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 56 male Wistar-Old rats weighing 300g from Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 01/15/2019.

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA-FMRP – USP

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315.3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br

Apêndice

APÊNDICE

Estatística Descritiva das variáveis estudadas										
		Média	Desvio Padrão	Mediana	Intervalo de confiança 95%		1o Quartil	3o Quartil	Mínimo	Máximo
					Limite Inferior	Limite Superior				
Peso	CON	1,17	0,16	1,17	0,92	1,45	1,04	1,23	0,99	1,55
	TSF	1,12	0,15	1,11	0,93	1,29	1,04	1,24	0,85	1,33
	TEA	1,08	0,10	1,06	0,99	1,19	1,00	1,16	0,96	1,26
	SFEA	1,11	0,10	1,10	0,95	1,19	1,01	1,21	0,98	1,27
Comprimento	CON	42,65	1,90	43,40	43,67	44,81	40,50	44,50	40,50	44,60
	TSF	44,12	1,61	44,35	43,66	46,43	43,12	45,42	41,01	46,20
	TEA	43,16	0,81	42,99	42,00	43,65	42,69	43,64	41,82	44,83
	SFEA	44,37	0,99	44,05	43,25	44,87	43,65	45,13	43,18	46,41
BV	CON	4,41	0,81	3,88	3,41	5,41	3,81	5,28	3,79	5,49
	TSF	4,91	1,82	5,66	2,65	7,17	3,13	6,32	2,07	6,57
	TEA	4,51	0,51	4,53	3,88	5,14	4,02	4,99	3,90	5,17
	SFEA	4,23	1,66	4,62	2,17	6,30	2,76	5,51	1,61	6,07
BVTv	CON	75,49	10,55	76,71	62,38	88,59	65,00	85,37	61,28	86,18
	TSF	73,16	20,01	80,46	48,32	98,00	57,23	85,43	38,22	88,29
	TEA	85,26	4,77	86,92	79,33	91,19	80,88	88,82	77,49	89,74
	SFEA	75,94	14,69	77,36	57,70	94,18	61,45	89,72	56,40	91,93
TbN	CON	2,63	0,26	2,76	2,30	2,96	2,35	2,85	2,35	2,90
	TSF	2,39	0,30	2,42	2,02	2,77	2,11	2,65	1,94	2,73
	TEA	2,59	0,18	2,66	2,37	2,81	2,40	2,75	2,39	2,78
	SFEA	2,54	0,30	2,50	2,17	2,91	2,32	2,78	2,27	3,05
TbSp	CON	,136	,045	,119	0,080	0,192	,099	,181	,098	,204
	TSF	,178	,084	,142	0,073	0,283	,114	,260	,107	,312
	TEA	,123	,030	,118	0,085	0,160	,097	,151	,085	,167
	SFEA	,127	,062	,127	0,050	0,204	,076	,178	,068	,227
TbTh	CON	,292	,068	,264	0,208	0,376	,234	,364	,219	,367
	TSF	,301	,059	,324	0,228	0,375	,255	,337	,197	,341
	TEA	,331	,036	,331	0,286	0,375	,299	,362	,279	,376
	SFEA	,304	,074	,340	0,212	0,396	,233	,358	,185	,368
Po	CON	24,51	10,55	23,29	11,41	37,62	14,63	35,00	13,82	38,72
	TSF	26,84	20,01	19,54	2,00	51,68	14,57	42,77	11,71	61,78
	TEA	14,74	4,77	13,08	8,81	20,67	11,19	19,12	10,26	22,51
	SFEA	24,06	14,69	22,64	5,82	42,30	10,28	38,55	8,07	43,60
CMO	CON	,008	,002	,008	0,006	0,011	,006	,009	,005	,011
	TSF	,010	,003	,010	0,009	0,010	,009	,011	,007	,017
	TEA	,009	,002	,008	0,007	0,011	,007	,010	,006	,013
	SFEA	,008	,001	,008	0,007	0,010	,007	,008	,006	,010

DMO	CON	,104	,025	,104	0,087	0,150	,080	,119	,071	,151
	TSF	,140	,037	,129	0,117	0,136	,121	,152	,098	,234
	TEA	,117	,029	,114	0,084	0,146	,094	,131	,074	,179
	SFEA	,103	,018	,101	0,088	0,135	,092	,115	,077	,138
Fmax	CON	51,44	8,00	49,18	44,09	65,73	44,60	58,40	41,02	65,58
	TSF	57,69	12,66	56,47	47,77	80,44	45,60	72,18	41,08	76,07
	TEA	65,36	12,21	64,59	53,81	74,53	53,76	73,62	49,00	89,75
	SFEA	52,08	9,79	50,87	41,59	71,43	43,72	55,64	42,02	72,38
Rigidez	CON	26,71	5,79	25,41	22,93	36,25	22,94	31,03	16,47	36,43
	TSF	36,42	11,23	35,62	22,90	57,60	29,38	38,70	23,32	64,65
	TEA	41,18	11,96	43,91	19,13	59,48	30,87	50,41	20,47	59,95
	SFEA	34,32	11,92	31,53	24,53	40,23	27,56	44,56	15,16	56,24
Neoformação	CON	18,51	2,09	18,51	15,92	21,10	16,78	20,25	15,18	20,64
	TSF	23,66	6,35	23,70	15,78	31,54	18,45	28,85	15,40	33,00
	TEA	31,68	4,34	33,00	26,29	37,07	27,35	35,35	25,60	36,60
	SFEA	21,84	20,54	15,20	-3,66	47,34	7,60	39,40	6,90	57,00
BV = volume ósseo; TV = volume de trabéculas; TbN = número de trabéculas; TbSp = espaço trabecular; TbTh = espessura trabecular; Po = porosidade; CMO = conteúdo mineral ósseo; DMO = densidade mineral óssea; Fmax = força máxima; CON = grupo sem tratamento; TSF = tratados com selante de fibrina; TEA = tratados com enxerto autólogo; SFEA = tratados com selante de fibrina e enxerto autólogo										